

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal bovin en fin de gestation

par

SÉBASTIEN MAURICE CZESLAW BUCZINSKI

Département des sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de

Maître es sciences

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

Décembre 2008

© Sébastien Maurice Czeslaw Buczinski, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**ÉVALUATION ULTRASONOGRAPHIQUE DU BIEN-ÊTRE FŒTAL BOVIN
EN FIN DE GESTATION**

Présenté par :

SÉBASTIEN MAURICE CZESLAW BUCZINSKI

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Denis Vaillancourt, président-rapporteur

Gilles Fecteau, directeur de recherche

Réjean C. Lefebvre, codirecteur

Lawrence C. Smith, codirecteur

Michèle Brochu, membre du jury



Résumé

L'évaluation ultrasonographique du fœtus et de ses annexes en fin de gestation est une technique très largement utilisée en médecine humaine. Cependant peu de données sont disponibles en chez les bovins. L'émergence de techniques de reproduction assistées avec un taux de réussite peu élevé et des complications nombreuses rend pertinent l'évaluation échographique du fœtus et de ses annexes en fin de gestation chez la vache. Le but de cette étude était donc d'utiliser l'ultrasonographie transabdominale afin d'analyser différents paramètres impliqués dans le bien-être fœtal (fréquence cardiaque, activité et diamètre aortique thoracique fœtaux, surface des placentomes, échogénicité des liquides fœtaux, profondeur maximale des liquides fœtaux) et de vérifier la faisabilité de cette technique chez la vache en fin de gestation lors de gestations normales, à risque suite à une maladie maternelle ou issue de clonage de cellules somatiques. L'examen ultrasonographique transabdominal du fœtus et de ses annexes est possible en fin de gestation chez la vache. Lors de gestations normales, dans les 10 jours précédant la naissance, la fréquence cardiaque fœtale moyenne était de 115 ± 10 battements par minute (variant de 96 à 128). Aucun des fœtus n'était inactif durant la totalité de l'examen. La majorité des fœtus étaient actifs moins des deux tiers de la durée totale de l'examen (30 minutes). Le diamètre de l'aorte thoracique était corrélé au poids du fœtus à la naissance ($p=0,01$; $R=0,62$). L'absence de battement cardiaque était un signe de mortalité fœtale lors de gestation à risque ou issues du clonage. De même, les fœtus actifs durant la totalité de l'examen sans phase de repos avaient un mauvais pronostic (mortalité périnatale). La surface placentaire moyenne était de $20 \pm 5 \text{ cm}^2$ chez le groupe contrôle, de $22 \pm 9 \text{ cm}^2$ lors de gestation à risque suite à une maladie maternelle et de $23 \pm 8 \text{ cm}^2$ lors de gestations issues de clonage somatique ce qui ne différait pas façon significative. Les résultats de cette étude sur l'évaluation du bien-être fœtal bovin en fin de gestation par l'examen ultrasonographique transabdominal montrent que ce moyen d'imagerie est prometteur pour évaluer le fœtus et

ses annexes. De futures études devraient confirmer l'importance de cette technique comme moyen de surveillance des gestations bovines à risque.

Mots-clés : Bien-être fœtal, ultrasonographie transabdominale, veaux clonés, gestations à risque

Abstract

The ultrasonographic assessment of the fetus and the uterine annexes is a widespread technique used in human obstetric to assess fetal health. The information is scant concerning its use in cattle. With the advance of assisted reproductive technologies with a high rate of fetal and neonatal losses such as somatic cloning and the presence of multiple maternal diseases that can have a detrimental impact on the pregnancy, it is important to assess the usefulness of non invasive techniques that can give information on fetal health. The aim of this study was to describe the ultrasonographic parameters that could be used to assess fetal well-being (fetal heart rate, fetal activity, fetal thoracic aortic diameter, placentome area, echogenicity of uterine fluid, maximal depth of uterine fluids) and to test the feasibility of transabdominal ultrasonography for late fetal assessment in control, high-risk, and cloned pregnancies. Our results showed that transabdominal ultrasonography of the fetus and the uterus can be done in cattle and valuable information can be obtained during this examination. In control pregnancies the mean fetal heart rate was 115 ± 10 beats per minute (range from 96 to 128). The absence of fetal heart beat was an indicator of fetal death. The thoracic aortic diameter was correlated with the birth weight in control pregnancy ($p=0.01$; $R=0.62$). No fetuses were inactive throughout the examination period (30 min). Most of the fetuses were active less than the two third of the total examination time. In high-risk and cloned pregnancies, the fetuses with a permanent activity had a poor outcome as well as fetuses were permanently active. The mean placentome area was 20 ± 5 cm² in control pregnancies, 22 ± 9 cm² in high-risk pregnancy and 23 ± 8 cm² in cloned pregnancy which were not statistically different. Those results showed that the late term fetal ultrasonographic assessment can give valuable information in cattle. Further works should be performed to confirm the importance of this technique to assess fetal health in late pregnancy especially in high-risk pregnancies.

Keywords : Fetal well-being, transabdominal ultrasound, cloned calves, high-risk pregnancies

Table des matières

Liste des figures, des tableaux et des annexes.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Chapitre 1 : Recension de la littérature	3
1.1 Définitions et rappels préalables	3
1.1.1 Bien-être fœtal.....	3
1.1.3 Rappels concernant la fin de la gestation des bovins.....	4
1.1.4 Anomalies et hydromyosies des annexes fœtales	7
1.2 Recension de la littérature.....	10
1.2.1 Évaluation des annexes fœtales.....	12
1.2.2 Évaluation du fœtus	17
1.2.2 Évaluation du fœtus	17
1.3 Hypothèses et Objectifs de l'étude.....	23
1.3.1 Hypothèses de l'étude	24
1.3.2 Objectifs de l'étude	24
Chapitre 2 : Méthodologie	25
2.1 Animaux utilisés	25
2.1.1 Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal chez une cohorte de 10 gestations de clones.....	25
2.1.2 Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal bovin en fin de gestation lors de gestations normales, à risque ou issues de clonage de cellules somatiques.....	25
2.2 Méthodologie générale et technique d'évaluation ultrasonographique transabdominale du fœtus et de ses annexes	26
2.2.1 Évaluation du fœtus	26
2.2.2 Évaluation ultrasonographique des annexes fœtales.....	27
2.2.3 Évaluation du devenir des gestations et des veaux nouveaux-nés	28

2.3	Spécificités de chacune des deux études effectuées.....	29
2.3.1	Évaluation ultrasonographique du bien être fœtal chez une cohorte de 10 gestations de clones.....	29
2.3.2	Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal bovin en fin de gestation lors de gestations normales, à risque ou issues de clonage de cellules somatiques	29
2.4	Analyses statistiques des deux études	30
2.4.1	Évaluation ultrasonographique du bien être fœtal chez une cohorte de 10 gestations de clones.....	30
2.4.2	Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal bovin en fin de gestation lors de gestations normales, à risque, ou issues de clonage de cellules somatiques	30
Chapitre 3	: Articles.....	32
3.1	Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal chez une cohorte de 10 gestations de clones	33
3.2	Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal bovin en fin de gestation lors de gestations normales, à risque ou issues de clonage de cellules somatiques	59
Chapitre 4	: Discussion générale des résultats.....	84
Conclusion	89
Bibliographie	91

*À la mémoire de Maurice Pallini, Czeslaw
Buczinski et Jacqueline Franchini*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dr Gilles Fecteau, mv, mon directeur de maîtrise et également directeur pendant mon résidanat au CHUV de la Faculté de médecine vétérinaire pour m'avoir permis de m'intéresser au bien-être foetal évalué par l'examen échographique chez la vache ainsi que pour ses nombreux conseils et son aide précieuse pour réaliser l'ensemble de ce projet.

Je veux également remercier mes deux co-directeurs de maîtrise les Dr Réjean C. Lefebvre, mv et Dr Lawrence C. Smith, mv pour leur collaboration tout au long de ce projet.

A Xavier Loichot, Dr Vét et Jérôme Brunault, Dr Vét; mes maîtres praticiens vétérinaires.

À Mme le Pr Brugère-Picoux pour son soutien de tous les instants.

Je remercie aussi ma famille pour son aide et sa générosité.

Et aux autres que j'oublie...

Liste des figures, des tableaux et des annexes

Figure 1 : Aspect macroscopique de la placentation bovine au cours d'une césarienne réalisée à 275 jours de gestation. 5

Figure 2 : Topographie abdominale droite chez une vache gestante de plus de 6 mois. 6

Figure 3 : Aspect anatomique d'une coupe transversale de l'abdomen bovin passant par la 3^{ème} vertèbre lombaire chez une vache de plus de 6 mois de gestation. 7

Figure 4 : Aspect schématique d'une coupe transversale de l'utérus gestant chez une vache afin de mettre en évidence les relations entre les cavités allantoïde et amniotique. 9

Figure 5 : représentation schématique des 4 quadrants utérins arbitrairement définis lors de l'évaluation ultrasonographique transabdominale de l'utérus gravide chez la vache au cours du 3^{ème} tiers de gestation. 28

Liste des tableaux du premier article

Table 1 : Health status of the dam, evolution of the pregnancy, and outcome of cloned calves/fetuses. 56

Table 2 : Results of ultrasonographic assessment of late pregnancy cloned fetuses/calves. 57

Table 3 : Comparison of ultrasonographic findings in heifers # 4, 6, and 8, on which more than 1 ultrasonographic examination was performed. 58

Liste des tableaux du second article

Figure 1 : Anatomic topography of the gravid uterus in bovine late pregnancy (right lateral and transversal views). 78

Figure 2 : Practical assessment of transabdominal ultrasonography for the fetal well-being in late pregnancy in the cow. 79

Figure 3: Association between thoracic aortic diameters determined by transabdominal ultrasonography and newborn body weight in CONTROL, HIGH-RISK and CLONED pregnancies. 80

Table 1 : Results of the different quantitative data obtained by transabdominal ultrasonography in control pregnancies, compromised pregnancies and cloned pregnancies. 81

Table 2 : Fetal activity scores repartition and mean fetal heart rate (FHRm) repartition according to the fetal activity. 82

Table 3 : Ultrasonographic measure of the deepest pocket of fetal fluid in CONTROL, HIGH-RISK and CLONED pregnancies. 83

Annexes

Annexe 1 : Fiche d'examen ultrasonographique du bien-être fœtal. I

Annexe 2 : Article de revue de littérature publié dans Canadian Veterinary Journal 2007;48:178-183. II

Liste des abréviations utilisées

ABG : arterial blood gas

ACTIV: fetal **activity**

Ao: fetal thoracic aortic diameter

ART : assisted reproductive technologies

BHB : beta-hydroxybutyrate

BW : birth weight

CBC : complete cell blood count

CHUV : centre hospitalier universitaire vétérinaire

FM : fetal body **movement**

FBM : fetal **breathing movements**

FHR: fetal **heart rate**

FHRV: fetal **heart rate variability**

GGT: gamma glutamyl-transferase

IGF : insulin-like **growth factor**

IUGR: intra **uterine growth restriction**

IVP: in vitro **production**

L/S : ratio **lécithine/sphingomyéline**

LOS: large offspring **syndrome**

MThick: amniotic **membrane thickness**

NICU: neonatal intensive **care unit**

NS: non survivor calf

PLAC: mean **placentome area**

RD: respiratory **distress**

S: survivor calf

TRA : technologies de reproduction **assistée**

Introduction

L'évaluation du fœtus au sein de son environnement utérin constitue un enjeu majeur de la médecine obstétricale (Cornette, 2004). Différentes techniques médicales, qu'elles soient plus ou moins invasives, ont été développées afin de mieux comprendre les interactions fœto-maternelles. L'ensemble de ces techniques d'évaluation prénatale a récemment été révisé au sein d'une des directives cliniques de la Société des Obstétriciens et Gynécologues du Canada (Davies et al., 2000). Cette directive définit l'utilisation des techniques actuellement disponibles pour les gynécologues obstétriciens ainsi que leur utilité à évaluer le fœtus *in utero*. De nombreux moyens d'évaluation fœtale sont en effet, disponibles en médecine humaine où l'évaluation fœtale et utérine constituent une partie intégrante du suivi des grossesses, qu'elles soient considérées à risque ou non (Manning, 1999). L'examen ultrasonographique du fœtus et de ses annexes (Manning, 1999), l'électrocardiographie fœtale (Peters et al., 2001; Rosen et Amer-Wahlin, 2004), l'évaluation continue de la fréquence cardiaque du fœtus par une sonde Doppler en relation avec les contractions utérines (Peters et al., 2001) et l'amniocentèse (Moore, 1997; O'Donoghue et al., 2007) sont les examens les plus utilisés en médecine humaine. Cependant cette portion de médecine prénatale est pour l'instant peu développée en médecine vétérinaire. Quelques études ont néanmoins permis de développer une procédure évaluation échographique du fœtus et de l'utérus chez la jument (Reef et al., 1995 ; Reef et al., 1996 ; Bucca et al., 2005). De plus, de nombreux modèles expérimentaux de gestations à risques ont été réalisés pour la médecine humaine en se servant de la gestation ovine (Anthony et al., 2003). Les homologues entre les deux espèces concernent notamment la taille de la mère et du fœtus. Les informations disponibles concernant l'évaluation prénatale du fœtus au cours de la gestation sont limitées chez le bovin (Fraser, 1989; Jonker et al., 1989; Jonker et al., 1993; Jonker et al., 1994; Jonker et al., 1996; Chavatte-Palmer et al., 2000; Heyman et al., 2002; Jonker, 2004; Breukelman, 2006). Les deux raisons principales sont l'absence de données concernant la faisabilité d'une telle évaluation sur des animaux de grande taille, ainsi que la pertinence de celle-ci sur un animal ayant une valeur économique limitée.

L'avènement des technologies de reproduction assistées (TRA) comme la fécondation *in vitro* ou le clonage à partir de cellules somatiques a modifié la valeur des fœtus issus de ces techniques. Les TRA sont en effet des techniques coûteuses, avec un taux de réussite global faible, notamment pour le clonage. Cette TRA s'accompagne en effet d'un taux de succès de 5 à 8% des embryons initialement transférés aboutissant à la naissance d'un veau (Chavatte-Palmer et al., 2000). De plus, le clonage s'accompagne de nombreuses anomalies fœtales, maternelles et/ou placentaires pouvant aboutir à un avortement, une morbidité/mortalité fœtale ou périnatale (Fecteau et al., 2005 ; Buczinski et al., 2007bc). Dès lors, il apparaît important de pouvoir diagnostiquer le plus précocément possible des anomalies fœtales ou utérines pouvant mener à une diminution du pronostic vital du nouveau-né afin de pouvoir gérer au mieux ces gestations à risque.

Chapitre 1 : Recension de la littérature

1.1 Définitions et rappels préalables

1.1.1 Bien-être fœtal

Même si la définition du terme bien-être est utilisée pour définir un sentiment, une sensation d'épanouissement, de confort, de satisfaction générale tant en parlant du corps que de l'esprit (grand dictionnaire, 2009); les termes de bien-être fœtal en français ou leur traduction anglaise *fetal well-being* sont consacrés de façon universelle par les spécialistes gynécologues et obstétriciens. Cette notion médicale n'inclut pas de dimension spirituelle au bien-être du fœtus puisque il est difficile de définir cet aspect du bien-être du fœtus. Ainsi, d'un point de vue médical, le bien-être fœtal constitue l'état normal du fœtus au cours de la gestation. Cet état est donc essentiellement un état d'intégrité physique déterminé grâce à une évaluation du développement anatomique et physiologique du fœtus ainsi qu'une évaluation de l'ensemble des conditions environnementales (essentiellement utérine) pouvant potentiellement compromettre l'intégrité physique du fœtus et son devenir intra ou extra-utérin (Cabrol et al., 2003).

Différents tests diagnostiques sont reconnus par la Société des Gynécologues et Obstétriciens du Canada comme moyen d'évaluation prénatale du bien-être fœtal (Davis et al., 2000). Parmi ces tests qu'utilisent les gynécologues se retrouvent notamment l'évaluation de l'activité fœtale effectuée par la mère (qui compte elle-même les mouvements fœtaux), l'évaluation cardiotocographique (étude de la fréquence cardiaque fœtale) avec ou sans contractions utérines provoquées, l'évaluation ultrasonographique du comportement fœtal (également appelé profil biophysique fœtal) et du volume de liquide amniotique, ainsi que la vélocimétrie Doppler du cordon ombilical fœtal.

1.1.2 Gestations à risque et souffrance fœtale

Le terme de gestation à risque est également un terme consacré en médecine obstétricale. Cet terme décrit les gestations qui surviennent chez une mère atteinte d'une maladie pré-existante que la gestation peut aggraver qui peut compliquer l'accouchement ou influencer sur

l'état de santé du fœtus (Larousse, 2009). De plus tout évènement survenant au cours de la gestation et qui comporte un risque pour la mère ou le fœtus peut être considéré comme pathologique (Larousse, 2009) et donc potentiellement à risque pour la gestation.

De ce fait, le terme de gestations à risque (ou sa version anglaise *high-risk pregnancies*) sera utilisé au cours de ce mémoire pour définir des gestations qui sont considérées comme potentiellement pathologiques suite à une maladie maternelle pouvant compromettre la survie du fœtus, suite à des anomalies placentaires et annexielles et des anomalies ou des maladies du fœtus.

L'intérêt principal d'évaluer le bien-être fœtal est de déceler une anomalie de l'intégrité physique ou physiologique du fœtus. Comme le principal mécanisme par lequel différents processus pathologiques compromettent la gestation consiste à limiter les échanges gazeux fœto-maternels et surtout la disponibilité de l'oxygène pour le fœtus (Lindsay, 1999). La plupart des techniques d'évaluation du bien-être fœtal visent à déceler une ischémie ou hypoxémie fœtale. Dès lors que l'apport en oxygène de la mère vers le fœtus sera compromis et que des altérations physiques ou physiologiques fœtales ou annexielles seront observées, on parlera de comme en médecine obstétricale et gynécologique humaine de souffrance fœtale (ou son équivalent anglophone : *fetal distress*) (Low, 1997).

1.1.3 Rappels concernant la fin de la gestation des bovins

La gestation bovine dure en moyenne 280 jours dans la race Holstein dont il sera principalement question. La placentation bovine est une placentation de type épithéliochoriale. Le placenta est distribué sous formes de 75 à 120 placentomes ovoïdes répartis sur la surface utérine (Jainudeen et Hafez, 1993). Chaque placentome est constitué de l'association d'une caroncule utérine (coté maternel) sur lequel vient s'insérer un cotylédon (coté fœtal) (Youngquist, 2007) (Figure 1).

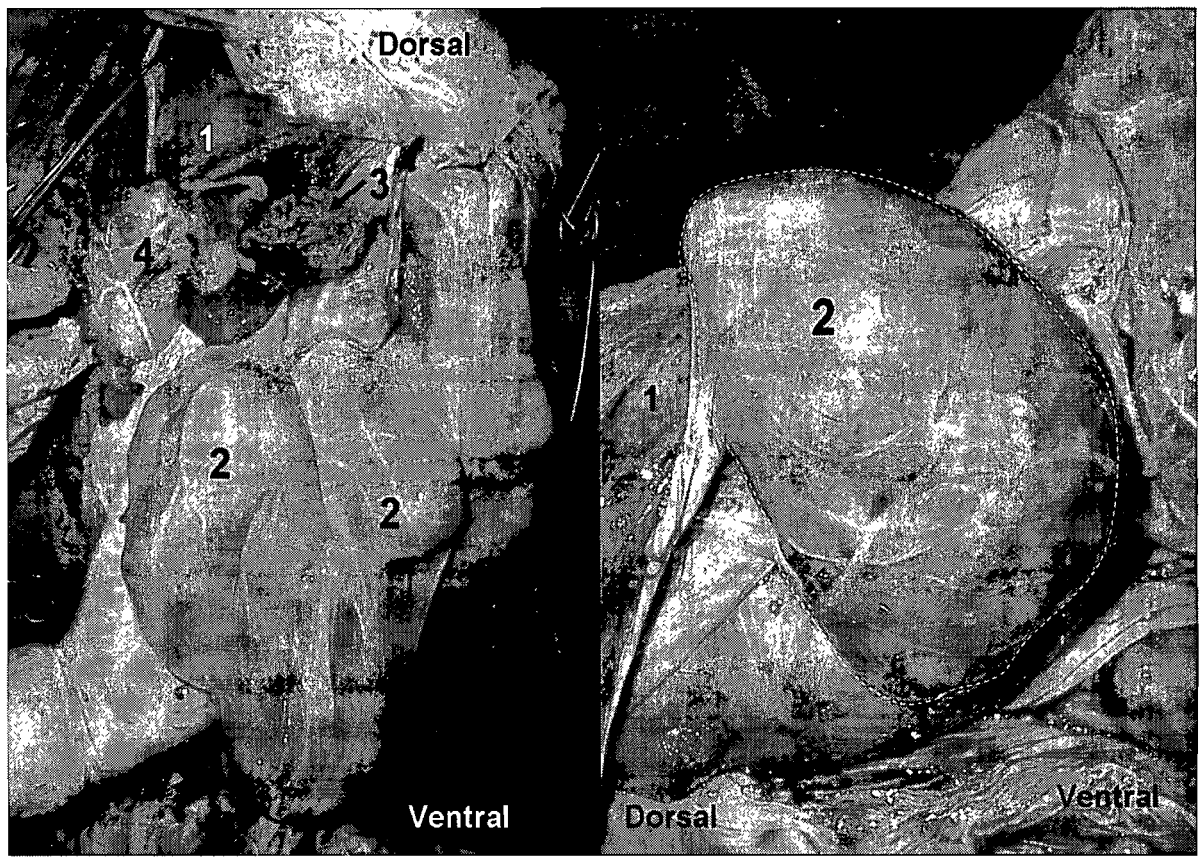


Figure 1 : Aspect macroscopique de la placentation bovine au cours d'une césarienne réalisée à 275 jours de gestation. La paroi utérine est visualisée (1), les placentomes (2) sont également visibles. La séparation effectuée manuellement entre la portion fœtale et maternelle du placentome laisse voir la caroncule utérine (3) ainsi que le cotylédon fœtal (4). (Photo CHUV)

Les annexes du fœtus sont également constituées de l'amnios contenu la cavité amniotique entourant le fœtus ainsi que de la cavité allantoïdienne contenant le liquide allantoïdien. Ces deux cavités sont séparées par la membrane amniotique.

Au fur et à mesure de la progression de la gestation, l'utérus, le fœtus et ses annexes grossissent. Ces changements s'accompagnent d'un déplacement de l'utérus gestant

cranialement ainsi que d'une descente de l'utérus au sein de la cavité abdominale (Barone, 2001). Du fait de la présence du rumen, l'utérus gravide occupe généralement la portion ventrale droite de l'abdomen (Figure 2, Figure 3). Ces connaissances anatomiques sont des pré-requis indispensables afin de pouvoir évaluer le fœtus bovin et ses annexes en fin de gestation.

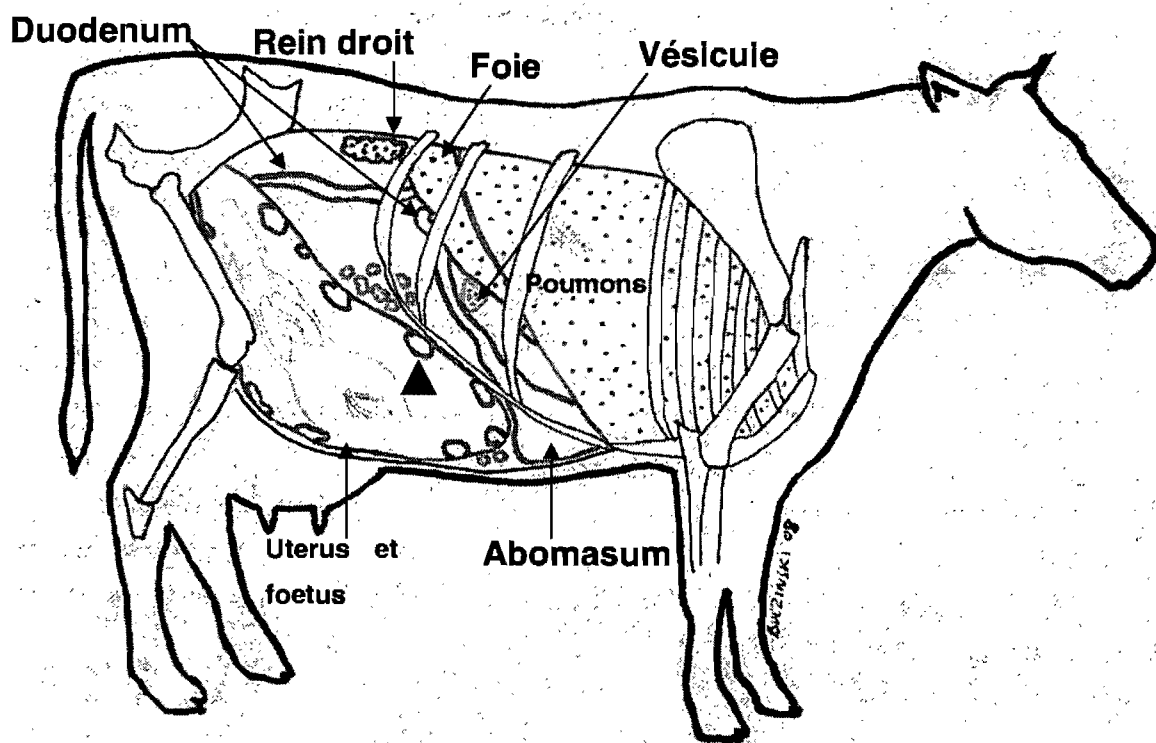


Figure 2 : Topographie abdominale droite chez une vache gestante de plus de 6 mois. L'utérus gravide a basculé dans la portion ventrale du flanc droit. Des placentomes sont également visibles en coupe transversale (pointe de flèche).

Modifié d'après Robert Barone In : Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Planche 368.

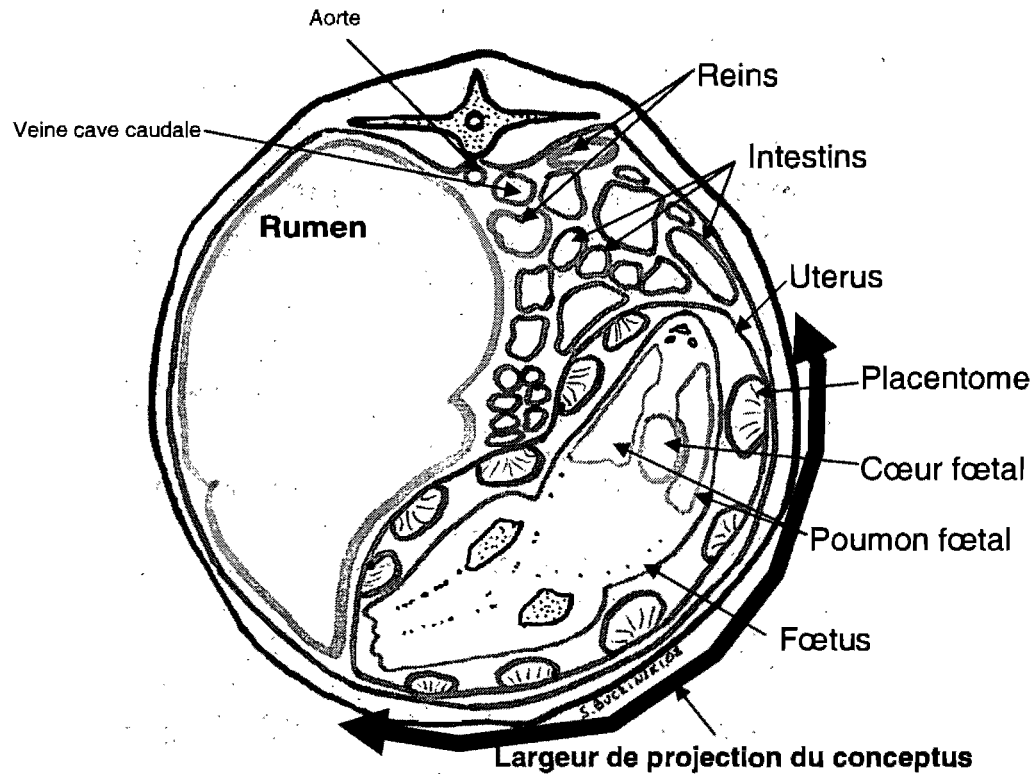


Figure 3 : Aspect anatomique d'une coupe transversale de l'abdomen bovin passant par la 3^{ème} vertèbre lombaire chez une vache de plus de 6 mois de gestation. La largeur de projection du conceptus est matérialisée par une double flèche noire.

Modifié d'après Robert Barone In : Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Planche 364.

1.1.4 Anomalies et hydropisies des annexes fœtales

Différentes anomalies peuvent affecter le placenta, l'amnios et l'allantoïde (Figure 4). Seul un bref rappel des affections des cavités amniotique et allantoïde qui sont utiles à la compréhension de notre étude sera présenté dans ce paragraphe. Le liquide amniotique est le liquide présent dans la cavité amniotique entourant directement le fœtus pendant la

gestation, il est issu de la sécrétion active des cellules de la membrane amniotique et sa production est également régulée par le fœtus (production par l'appareil respiratoire et urinaire fœtal, résorption par la déglutition) et les échanges placentaires (Haddad et Cabrol, 2003). La cavité allantoïde est très développée dans la gestation des bovins à la différence de la gestation chez la femme (Barone, 2001). Le liquide allantoïde qui est contenu dans la cavité allantoïde est principalement produit par l'appareil urinaire fœtal (via le canal de l'ouraque qui chemine de l'apex de la vessie fœtale via le cordon ombilical vers la cavité allantoïde) et par une sécrétion active placentaire (Peek, 2007).

Les anomalies de l'allantoïde et de l'amnios sont rares chez les bovins. Les deux entités les plus fréquemment retrouvées sont l'hydro-allantoïde et l'hydramnios. L'hydro-allantoïde est plus fréquemment retrouvée que l'hydramnios chez les bovins, tant lors de gestations issues de saillies naturelles ou d'inséminations artificielles (Peek, 2007; Vandessplasche et al., 1965) que lors de gestations issues de clonage de cellules somatiques (Chavatte-Palmer et al., 2000). Cette anomalie se caractérise par l'accumulation rapide de liquide allantoïde dans la cavité allantoïde et s'accompagne d'un dépérissement marqué de la mère accompagné d'une importante distension abdominale (Peek, 2007). Le pronostic vital est alors souvent engagé tant pour la mère que le fœtus (Peek, 2007; Vandessplasche et al., 1965). Lors d'hydramnios, l'accumulation d'une grande quantité de liquide amniotique est observée. Cette maladie gestationnelle qui est rare chez le bovin s'accompagne souvent d'anomalies héréditaires ou congénitales du fœtus. Le pronostic est jugé bon pour la mère mais mauvais pour le fœtus du fait des anomalies variables qu'il peut présenter (Peek, 2007).

Enfin l'oligoamnios ou oligohydramnios est une affection souvent rencontrée en médecine humaine (Fournet, 2003) mais rarement décrite en médecine vétérinaire (Edwards et al., 1997). Ces deux termes qui sont des synonymes décrivent des cas où la quantité de liquide amniotique est anormalement faible. Cette faible quantité de liquide amniotique est le plus fréquemment associée chez la femme à diverses malformations fœtales, des causes iatrogènes (anti-inflammatoires à doses répétées, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de

l'angiotensinogène, ou chimiothérapie) ou à une souffrance fœtale notamment suite à une insuffisance vasculaire utéro-placentaire (Fournet, 2003). La distinction des 3 entités précédemment notées (hydro-allantoïde, hydramnios et oligohydramnios) est un préambule important à la compréhension de notre étude puisqu'elles mettent l'emphasis sur l'importance d'évaluer la quantité de liquides fœtaux présents lors de la gestation.

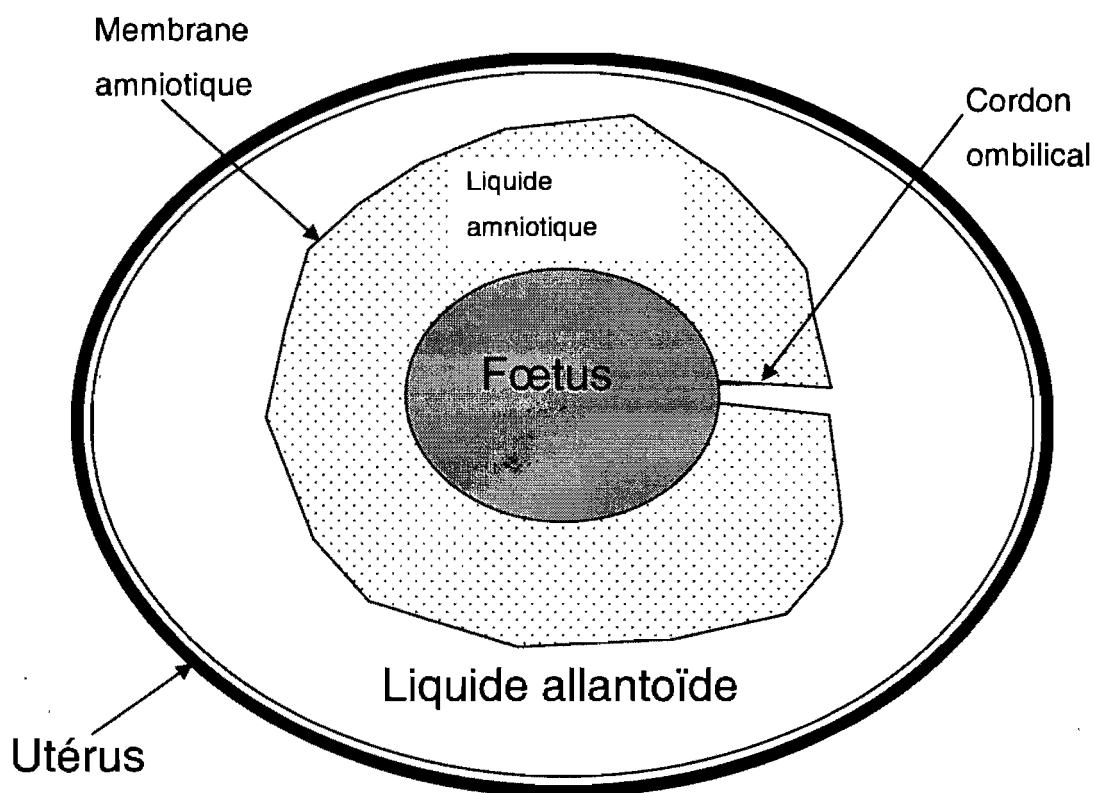


Figure 4 : Aspect schématique d'une coupe transversale de l'utérus gestant chez une vache afin de mettre en evidence les relations anatomiques entre les cavités allantoïde et amniotique.

1.2 Recension de la littérature

La naissance d'un veau en santé est le but ultime d'un bon programme de reproduction, mais pour augmenter l'efficacité de la reproduction, de nombreuses technologies de reproduction assistées (TRA), telles que les protocoles de suroovulation, le transfert embryonnaire, et plus récemment la production *in vitro* d'embryons ont été utilisées. Même si ces techniques sont laborieuses et coûteuses, elles permettent la production de veaux provenant d'animaux ayant un potentiel génétique supérieur à la population moyenne.

Le clonage animal, la plus récente TRA, est utilisé pour l'amélioration génétique (Smith et al., 2000), la conservation de races ou d'espèces menacées (Wells et al., 1998 ; Meirelles et al., 2001) et la production d'animaux transgéniques à des fins biomédicales (Bordignon et al., 2003). Même si les avantages potentiels des TRA sont importants pour la filière bovine, les gestations issues de la production *in vitro* d'embryon et de clonage ont été associées avec de nombreux problèmes des mères porteuses ainsi que des nouveaux-nés (Schmidt et al., 1996 ; Renard et al., 1999 ; Hill et al., 1999 ; Chavatte-Palmer et al., 2000 ; Tsunoda et Kato, 2002 ; Mello et al., 2003 ; Fecteau et al., 2005). Le syndrome du gros veau, qui est caractérisé par une gestation prolongée par rapport à sa durée normale, par un fœtus plus gros que la moyenne et une augmentation de la taille des placentomes a été rapporté chez les veaux issus de techniques de production *in vitro* (Schmidt et al., 1996 ; Hill et al., 1999 ; Chavatte-Palmer et al., 2000 ; Tsunoda et Kato, 2002 ; Mello et al., 2003). En outre, l'hydropisie fœtale a également souvent été rapportée lors de gestations issues du clonage (Hill et al., 1999 ; Mello et al., 2003).

Différentes maladies maternelles ou anomalies placentaires peuvent également avoir un impact sur le fœtus (Platt, 1984 ; Cottril et al., 1991 ; Baschat et Harman, 2001 ; Anthony et al., 2003 ; Greenwood et al., 2003 ; Pantaleon et al., 2003). À la différence du syndrome du gros veau, l'insuffisance placentaire entraîne une restriction de la croissance *in utero* et une naissance prématurée (Greenwood et Bell, 2003). Un stress maternel peut également initier la parturition, même si le veau n'est pas complètement adapté à la vie extra-utérine. Dans

les situations où la mère est affectée d'une maladie avec un mauvais pronostic, il serait intéressant de déterminer la maturité du fœtus. La gestion de ces gestations à risque constitue une tâche difficile pour le médecin vétérinaire.

Les premiers mois de la gestation bovine sont généralement surveillés lors des visites de médecine préventive effectuées au sein des troupeaux (DesCôteaux et al., 2009; Curran et al., 1986; Muller et Wittkowski, 1986). Cependant, peu de données sont disponibles concernant l'évaluation du fœtus et de l'utérus bovin lors des trois derniers mois de gestation. Chez la femme (Manning, 1999) et la jument (Ginther et al., 1993; Reef et al., 1995; Reef et al., 1996), des profils biophysiques ultrasonographiques ont été décrits et sont utilisés en pratique courante. Cette technique d'évaluation fœtale non invasive permet de détecter des anomalies des annexes fœtales et du fœtus avant sa naissance. Les gestations à risque peuvent alors être mieux appréhendées en référant la mère dans des unités de soins intensifs néonataux pour pouvoir gérer au mieux tout nouveau né à risque de développer des complications périnatales.

Cette recension de la littérature révisé les techniques présentement disponibles pour évaluer le bien-être fœtal et met l'emphasis sur les différents paramètres ultrasonographiques pouvant être inclus dans un profil biophysique bovin afin d'évaluer la viabilité du fœtus et sa maturité au cours du dernier trimestre de gestation.

La revue de littérature a été basée sur les mots clés suivants: bien-être fœtal, bien-être fœtal et vétérinaire, mouvement fœtal, mouvement fœtal et vétérinaire, détresse fœtale, détresse fœtale et ultrasonographie, ultrasonographie et croissance fœtale, ultrasonographie et fin de gestation, profil biophysique, et corps lamellaires. Les moteurs de recherches utilisés étaient Medline et CAB Abstract. Les articles étaient inclus si leur information était pertinente pour la gestation bovine, effectuée chez les animaux de la ferme (petits ruminants et cheval), ou si leur information était utilisée chez la femme par les gynécologues ou obstétriciens. Toutes les études concernant l'évaluation de paramètres du bien-être fœtal chez les bovins et publiées dans des journaux avec révision par les pairs ont été incluses, à l'exception des études concernant le profil endocrinien des mères et des

fœtus, puisque l'étude endocrinienne des relations materno-fœtales était volontairement exclue de la présente étude. L'emphasis a été mise sur les techniques non invasives d'évaluation du bien-être fœtal dont l'examen ultrasonographique transabdominal.

1.2.1 Évaluation des annexes fœtales

Les annexes fœtales sont principalement constituées du liquide allantoïde, du liquide amniotique et du placenta. Chez les bovins la placentation se caractérise par la présence de 70 à 125 placentomes de forme ovoïde à ronde qui sont disséminés sur la surface utérine et chacun constitués de l'imbrication d'une caroncule utérine et d'un cotylédon placentaire (Youngquist, 2007; Jainudeen et Hafez, 1993). Cette placentation est caractéristique des ruminants et différente de la placentation diffuse sur l'ensemble de la surface utérine équine (Reef, 1998).

Lors du dernier trimestre de gestation, le conceptus bovin peut être évalué indirectement grâce aux annexes fœtales (liquide allantoïde, liquide amniotique et placenta). Contrairement à la jument (Reef et al., 1996) et la brebis (Anthony et al., 2003) qui a été utilisée comme modèle animal en recherche médicale humaine, seul un rapport concernant l'examen ultrasonographique des anomalies placentaires en fin de gestation a été publié chez le bovin (Heyman et al., 2002). Des modèles expérimentaux de retard de croissance intra-utérine chez les brebis ont montré une diminution de masse placentaire associée avec un retard de croissance des agneaux (Greenwood et Bell, 2003). Plusieurs des conditions expérimentales entraînant un retard de croissance intra-utérin chez les brebis peuvent être retrouvées chez les bovins (Mee, 2008) comme le fait de suralimenter les brebis gestantes pendant leur période de croissance (Wallace et al., 2000; Wallace et al., 1997). Dans ces expériences, une suralimentation est obtenue en servant une diète à haute teneur en énergie sans restriction durant la gestation de brebis nullipares n'ayant pas encore atteint leur poids adulte. Des modèles expérimentaux créant une sous-alimentation pendant la seconde moitié de gestation chez la brebis ont également été décrits aboutissant également à un retard de croissance des agneaux à la naissance (Greenwood et Bell., 2003; Everitt, 1967). Les

observations associées au retard de croissance *in utero* chez le mouton (Greenwood et Bell., 2003) suggèrent que l'ultrasonographie placentaire et que la taille des placentomes pourrait être des indices intéressants pour évaluer des anomalies de fin de gestation chez des vaches malades. Le retard de croissance observé chez les fœtus de brebis primipares suralimentées a été attribué à une réduction initiale de la croissance placentaire (Wallace et al., 2000). Les anomalies de l'unité fœto-placentaire constituent un élément important pour l'évaluation du bien-être fœtal en fin de gestation chez la jument (Reef et al., 1996; Pantaleon et al., 2003). Cependant, la placentation diffuse chez le cheval est différente de la placentation cotylédonaire des ruminants. Même si les informations concernant les caractéristiques du placenta des ruminants sont limitées, une comparaison visuelle des placentas expulsés suite à des vêlages de veaux issus de fécondation naturelle et de veaux issus de techniques de reproduction *in vitro* a montré que les veaux produits *in vitro* avaient des placentomes plus gros que les veaux issus de reproduction naturelle (Young et al., 1998; Hill et al., 1999; Bertolini et al., 2002). Les plus gros placentomes pourraient être le résultat d'une croissance placentaire compensatoire suivant l'insuffisance placentaire du premier trimestre de gestation (Bertolini et al., 2002). La croissance compensatoire des placentomes a été induite expérimentalement chez le mouton après l'exérèse chirurgicale de caroncules utérins au début de la gestation (Alexander, 1964). L'examen ultrasonographique des fœtus et du placenta en fin de gestation chez des vaches Holstein (dont la durée moyenne de gestation est de 280 jours) portant des fœtus issus du clonage ou des fœtus issus d'insémination artificielle a montré que la surface moyenne des placentomes à 232 jours de gestation était supérieure lors de gestations clonées (25.5 cm^2) par rapport à la surface moyenne obtenue chez des gestations contrôles (17 cm^2) (Heyman et al., 2002).

Les hydropisies sont des conditions fréquentes lors de gestations issues de clonage (Schmidt et al., 1996; Hill et al., 1999 ; Chavatte-Palmer et al., 2000; Bertolini et al., 2002; Heyman et al., 2002; Tsunoda et Kato, 2002; Mello et al., 2003 ; Wells, 2003; Fecteau et al., 2005). L'hydro-allantoïde est la condition d'hydropisie la plus commune chez la vache (Troy, 1993; Peek, 1997). Elle est associée à des anomalies placentaires ainsi qu'à une

dégradation de l'état général de la mère. Au contraire, l'hydramnios est associé à des anomalies fœtales congénitales (Troy, 1993; Peek, 1997). Les changements observés incluent une distension abdominale marquée chez la mère, l'augmentation de liquide au sein du compartiment affecté ainsi que l'épaississement des membranes allanto-amniotique ou chorio-allantoïde (Troy, 1993). À l'exception de la description de difficultés pour observer le fœtus lors de l'examen ultrasonographique de cas d'hydro-allantoïde (Heyman et al., 2002), il n'existe pas de description ultrasonographique précise de ces affections chez le bovin.

La diminution de la quantité de liquide fœtaux (oligohydramnios) est également considérée comme une trouvaille anormale chez la femme (Moore, 1997; Manning, 1999; Baschat et Harmann, 2001) et la jument (Reef et al., 1996; Reimer, 1997). Chez la femme, la mesure échographique de la profondeur du liquide amniotique est utilisée pour le diagnostic de l'oligohydramnios, qui est fréquemment associé à un retard de croissance *in utero*, à une asphyxie fœtale intra-partum avec une augmentation de la fréquence de déglutition du fœtus et une souffrance fœtale (Moore, 1997). Dans le profil biophysique équin créé par Reef et al en 1996, une diminution de la profondeur maximale des liquides fœtaux était significativement associée à un mauvais pronostic pour le fœtus examiné (Reef et al., 1996; Reimer, 1997). En se basant sur ces données, l'examen ultrasonographique transabdominal devrait donc être un outil intéressant pour le diagnostic des anomalies des liquides fœtaux chez le bovin.

Une échogénicité anormale du liquide amniotique a été décrite en relation avec de nombreuses affections fœtales chez le cheval telles que la placentite, la septicémie et le syndrome d'asphyxie peri-partum (Reef et al., 1996). Néanmoins, des variations d'échogénicité peuvent également être observées lors de gestations normales (Reef et al., 1996) ce qui indique que l'échogénicité des liquides fœtaux manque de spécificité en tant que facteur pronostique. Les liquides amniotiques et allantoïdes peuvent contenir des particules libres échogènes constituées de cellules desquamées et de cristaux urinaires (Adams-Brendenmuehl et Pipers, 1987; Manning, 1987). Chez les ruminants, de tels débris

semblent ne pas être observés en grande quantité lors de gestations normales et lorsqu'ils sont trouvés en grande quantité dans tous les liquides fœtaux, ils peuvent indiquer un fœtus en souffrance ou bien une mort fœtale (Jonker, 2004).

Le liquide amniotique peut être prélevé afin de prédire le niveau de maturité pulmonaire fœtale. Chez la vache et la femme, le rapport lécithine sur sphingomyéline (L/S) est corrélé à la production fœtale de surfactant pulmonaire (Eigemann et al., 1984; Zaremba et al., 1995; Moore, 1997). La lécithine et la sphingomyéline sont des phospholipides qui sont transférés du poumon fœtal vers la cavité amniotique. La concentration de sphingomyéline est stable au sein du liquide amniotique. En revanche, la quantité de lécithine augmente durant les derniers moments de la gestation, ce qui entraîne une augmentation du ratio L/S (Zaremba et al., 1995). Un faible ratio L/S à la naissance est associé à un mauvais pronostic vital pour les veaux (Eigemann et al., 1984; Zaremba et al., 1995). Les veaux nouveau-nés issus de gestation à risque peuvent développer des problèmes respiratoires de façon similaire à ceux retrouvés lors du syndrome de détresse respiratoire du nourrisson ((Eigemann et al., 1984; Zaremba et al., 1995)). La mesure du ratio L/S est longue et difficilement accessible dans les laboratoires. La médecine obstétricale a développé un test rapide d'évaluation de la maturité pulmonaire fœtale basé sur le comptage des corps lamellaires amniotiques (Gluck et al., 1971; Dubin, 1989). Les corps lamellaires amniotiques qui sont de petites particules lipidiques produites par les pneumocytes de type II, sont présents dans le surfactant et on en retrouve dans le liquide amniotique en quantité croissante au cours de la gestation (Beinlich et al., 1999). La concentration en corps lamellaires amniotiques augmente progressivement dans le liquide amniotique avec les mouvements de respiration du fœtus (Dubin, 1989; Greenspoon et al., 1995; Beinlich et al., 1999; Roiz-Hernandez et al., 2002). Comme ces particules ont une taille comparable (0.2-2µm) à celle des thrombocytes (1-3µm), leur comptage peut s'effectuer rapidement par les automates utilisés dans les laboratoires d'hématologie. Cette technique de détermination de la maturité pulmonaire fœtale est très intéressante en médecine humaine (Wijnberger et al.,

2001; Roiz-Hernandez et al., 2002), mais n'a pas été pour l'instant évaluée chez d'autres espèces.

Même si l'amniocentèse est considérée comme une technique relativement sécuritaire chez la femme avec des complications dans moins de 1% des cas, cette technique semble plus risquée chez la vache et la jument avec respectivement 8% (Callan et al., 2002) et 25% (Schmidt et al., 1991) de taux d'avortements induits par cette procédure.

1.2.2 Évaluation du fœtus

L'évaluation du fœtus en fin de gestation est un moyen fiable pour détecter des anomalies fœtales. Cependant, peu d'information est disponible en médecine vétérinaire contrairement aux données de la médecine humaine (Reef et al., 1996; Manning, 1999; Heyman et al., 2002; Pantaleon et al., 2003). Chez le cheval, le profil biophysique du fœtus inclue la fréquence cardiaque, les mouvements respiratoires, l'activité, la mesure de l'aorte thoracique ainsi que la taille de l'œil (Reef et al., 1996; Pantaleon et al., 2003).

La plupart des maladies maternelles pouvant affecter la gestation entraînent une réduction du flux sanguin utérin et de façon consécutive, une insuffisance placentaire (Cottrill et al., 1991; Ford et al., 1992). Le fœtus hypoxémique montre alors une bradycardie avec une diminution de la variabilité de sa fréquence cardiaque, une diminution des mouvements fœtaux et des mouvements de respiration fœtale (Bocking, 2003). Chez l'homme, la complexité des mouvements fœtaux, les mouvements respiratoires fœtaux, la variabilité de la fréquence cardiaque fœtale et l'augmentation de la fréquence cardiaque fœtale accompagnant une période d'activité sont utilisés comme marqueurs positifs du bien-être fœtal et comme indices du bon développement neurologique du fœtus (Romanini et Rizzo, 1995; Velazquez et Rayburn, 2002; Bocking, 2003). Le comportement fœtal est également un outil récemment développé en médecine obstétricale. Il est défini en fonction de la variabilité de fréquence cardiaque, des mouvements corporels et des mouvements oculaires fœtaux; il peut être classé en quatre états fœtaux : le sommeil passif, le sommeil actif, l'état réveillé non actif et réveillé et actif (Romanini et Rizzo, 1995). Un des principaux inconvénients de cette évaluation est la durée de l'examen qui est de 2 heures (Romanini et Rizzo, 1995). En outre, des obstétriciens Danois ont récemment montré qu'il n'y avait pas de consensus pour la définition de ce qu'est une diminution des mouvements fœtaux chez l'homme (Olesen et Svare, 2004). Selon ces chercheurs la médecine factuelle ne démontre pas de manière irréfutable que la surveillance fœtale *ante-partum* ait amélioré le pronostic périnatal. Chez le cheval, l'absence de mouvements fœtaux observés lors de l'examen chez deux juments a été associée à un mauvais pronostic pour la survie fœtale. Cependant, il

existe des périodes de sommeil fœtal chez le cheval qui se manifestent par des longues périodes d'inactivité fœtale et qui ont été rapporté sans aucun signe de détresse fœtale (Fraser et al., 1973; Ginther et Griffin, 1993; Reimer., 1997). La durée de l'inactivité fœtale est en général inférieure à 30 minutes mais peut durer de façon inhabituelle jusqu'à une heure (Fraser et al., 1973). Chez l'homme, il est fréquent que le fœtus soit inactif sans aucun mouvement. L'activité physique fœtale occupe 9 à 18% du temps en fin de la gestation et est plus fréquemment observée l'après midi et le soir que le matin (Fraser et al., 1973). Le fœtus équin semble en général plus actif que le fœtus humain chez qui les périodes de sommeil fœtal sont plus fréquentes. Cette information suggère que la diminution des mouvements fœtaux pourrait être un élément prédictif d'une anomalie fœtale mais nécessite d'être réévalué afin de pouvoir être confirmé comme indice de santé du fœtus équin (Reef et al., 1996). Cependant dans une étude récente se déroulant sur 3 ans et comprenant 150 gestations évaluées mensuellement du jour 150 au jour 300, puis de façon hebdomadaire jusqu'à la naissance, aucune corrélation n'a été établie entre l'activité fœtale et le pronostic fœtal chez l'espèce équine (Bucca et al., 2005). Ces données montrent que comme chez l'homme, la diminution ou l'absence de mouvements fœtaux ne doit pas être le seul paramètre pour déterminer si un fœtus est en santé ou en souffrance. Lorsque l'inactivité fœtale est observée, une réévaluation de la gestation doit être effectuée.

Chez la brebis, l'hypoxie placentaire engendrée par la diminution du flux sanguin utérin entraîne une diminution rapide des mouvements fœtaux (Bocking et Harding, 1986). Les mouvements respiratoires fœtaux sont observés avec des mouvements du diaphragme fœtal, en l'absence de mouvements fœtaux ou maternels (Manning, 1999; Reef et al., 1995; Reef et al., 1996; Pantaleon et al., 2003), pendant 30% du temps chez les fœtus humains et ovins en fin de gestation (Manning, 1987; Bocking, 2003). Chez le fœtus ovin hypoxique, on observe une diminution transitoire de la fréquence des mouvements respiratoires fœtaux, comme chez l'homme (Bocking et al., 1988; Bocking, 2003). Après une période de 12 à 16 heures de conditions hypoxiques pour le fœtus, la fréquence des mouvements respiratoires fœtaux revient à la normale malgré la persistance du phénomène d'hypoxie (Bocking et al.,

1988). A contrario, lorsque l'hypoxie fœtale est combinée à l'hypercapnie (par exemple suite à une occlusion du cordon ombilical), la fréquence des mouvements respiratoires fœtaux augmente constamment (Bocking, 2003). Dans une récente étude dans l'espèce équine, les mouvements respiratoires fœtaux ont été évalués sur 150 gestations, mais aucune association n'a été établie entre leur occurrence et le bien-être fœtal (Bucca et al., 2005).

Il existe peu d'informations concernant les mouvements fœtaux et les mouvements respiratoires fœtaux chez les bovins (Anthony et al., 2003; Bocking, 2003; Greenwood et Bell, 2003). Dans une étude de 1989, Fraser a utilisé l'ultrasonographie Doppler et la palpation transrectale de façon bi-quotidienne durant la dernière semaine de gestation chez des taures afin d'évaluer le comportement fœtal. Il a observé que tous les veaux démontraient une baisse d'activité dans les 24 heures qui précédaient leur naissance et que des mouvements complexes (plus de 4 composantes de mouvements isolées dans chaque période d'activité) étaient fréquemment rencontrés en fin de gestation, et possiblement associés à une maturation du système nerveux central. Néanmoins la profondeur de l'utérus et la taille du veau en fin de gestation sont des facteurs limitant à l'ultrasonographie fœtale (Jonker, 2004).

Chez la jument (Adams-Brandenmuehl et Pipers, 1987; Reef et al., 1995; Reef et al., 1996; Reimer, 1997; Pantaleon et al., 2003), la femme (Manning, 1987; Manning, 1999; Baschat et Harmann, 2001), la brebis (Dalton et al., 1977; Bocking, 2003; George et al., 2004), et la vache (Jonker et al., 1989; Jonker et al., 1993; Jonker et al., 1994; Jonker et al., 1996; Heyman et al., 2003) la fréquence cardiaque fœtale est le paramètre qui a été le plus fréquemment étudié pour évaluer le bien-être fœtal et la santé du fœtus en fin de gestation. Toutefois l'interprétation des fréquences cardiaques fœtales est compliquée (Bocking, 2003), notamment du fait que de nombreux facteurs sont impliqués dans sa régulation : barorécepteurs, chémorécepteurs, système nerveux sympathique et parasympathique, et l'activité fœtale (Guyton et Hall, 2000). Chez la femme et la brebis, la bradycardie fœtale est observée en réponse à l'hypoxie fœtale associée à une redistribution réflexe du débit

cardiaque (Manning, 2002; Bocking, 2003). Cependant, chez la brebis, cette bradycardie est transitoire, en effet, elle est suivie d'une période de tachycardie associée à la libération d'une grande quantité de catécholamines (Bocking, 2003). La variabilité de la fréquence cardiaque enregistrée sur une période de 30 minutes semble être plus précise que la fréquence cardiaque fœtale elle-même chez l'homme (Manning, 1999; Manning, 2002; Bocking, 2003). Les accélérations de la fréquence cardiaque ont lieu en réponse aux mouvements fœtaux, même si le fœtus est hypoxémique (George et al., 2004). En revanche, si les conditions hypoxiques persistent, les dommages au niveau de la moelle allongée sont à l'origine d'une perte de la variabilité de la fréquence cardiaque fœtale, comme démontré chez la brebis (George et al., 2004) et chez des fœtus humains anencéphaliques (Terao et al., 1984). L'augmentation de la fréquence cardiaque fœtale peut également être paroxystique lorsque les fœtus hypoxiques démontrent des activités épileptiformes (George et al., 2004). Chez la jument, l'évaluation du bien-être fœtal met l'accent sur la fréquence cardiaque fœtale plus que sur la variabilité de la fréquence cardiaque fœtale (Reef et al., 1996; Reimer, 1997). La diminution ou l'augmentation de la fréquence cardiaque fœtale par rapport à la fréquence cardiaque considérée normale (68 à 82 battements par minute (Reef et al., 1995)) est considérée comme trouvaille anormale (Reef et al., 1996; Reimer, 1997). Rantanen and Kincaid (1988) considèrent que la bradycardie fœtale est le facteur le plus spécifique d'une altération du bien-être fœtal chez le cheval. Une étude concernant 150 gestations équine de 150 jours de gestation au poulainage, en utilisant l'ultrasonographie comme moyen de suivi du bien-être fœtal a également montré que le rythme cardiaque fœtal était régulier tout au long de la gestation (Bucca et al., 2005).

De nombreux moyens différents ont été utilisés pour évaluer la fréquence cardiaque fœtale chez le bovin. Parmi eux on trouve des techniques non invasives telles que l'électrocardiographie fœtale, l'examen doppler transabdominal et l'ultrasonographie transabdominale (Too et al., 1965; Jonker et al., 1989; Jonker et al., 1993; Jonker et al., 1994). Des techniques plus invasives sont également disponibles comme la cathétérisation aortique fœtale et l'enregistrement de l'activité utérine par des électrodes implantées dans

le myomètre (Jonker et al., 1993). Les conclusions tirées de ces études sont que la fréquence cardiaque normale du fœtus bovin durant les deux dernières semaines de gestation est de 105 battements par minute (avec des variations de 90 à 125 battements par minute) (Jonker et al., 1994) et que des accélérations de la fréquence cardiaque fœtale accompagnent les mouvements fœtaux (Jonker et al., 1994). En outre, les contractions du myomètre n'influencent pas significativement la fréquence cardiaque fœtale (Jonker et al., 1993). Il n'existe pas de techniques pratiques permettant de déterminer la variabilité de la fréquence cardiaque et les mouvements fœtaux chez les bovins. Seules des mesures ponctuelles ou sur de courtes périodes de temps peuvent être effectuées avec des moyens non invasifs tels que l'échographie ou le Doppler. Reef et ses collaborateurs en 1996 ont proposé d'enregistrer 3 à 5 valeurs ponctuelles de la fréquence cardiaque lors de la réalisation de l'examen échographique pour la détermination du bien-être fœtal équin, si possible ces mesures doivent être prises avant et après mouvements du fœtus afin de permettre une évaluation des accélérations de la fréquence cardiaque fœtale.

Le but de l'évaluation du bien-être fœtal est de détecter toute anomalie physique ou physiologique du fœtus, de ses annexes et de l'utérus. Chaque anomalie du fœtus, de ses annexes ou de l'utérus peut avoir des répercussions sur les autres. Une des manifestations les plus communes des gestations anormales chez la femme (Baschat et Harmann, 2001), la jument (Platt, 1984; Reef et al., 1996) et la brebis (Wallace et al., 2000; Anthony et al., 2003) est le retard de croissance fœtal et un poids de naissance diminué par rapport à la normale. Une autre anomalie de développement fœtal se manifestant par des nouveau-nés anormalement gros a été associée avec les nouvelles technologies de la reproduction, telles que le clonage et la fertilisation *in vitro* a été décrite récemment (Young et al., 1998; Chavatte-Palmer et al., 2000; Bertolini et al., 2002; Heyman et al., 2002; Tsunoda et Kato, 2002; Fecteau et al., 2005). Chez l'homme et les ovins, différentes mesures fœtales et leur corrélation avec le poids du jeune à la naissance ont été étudiées, incluant le diamètre bipariétal fœtal et la circonférence abdominale fœtale (Baschat et Harmann, 2001; Marsal, 2002). Le diamètre bipariétal fœtal et la longueur de l'os métacarpe du fœtus ovin sont des

paramètres efficaces pour déterminer l'âge du fœtus et son poids de naissance (Greenwood et al., 2002). Des courbes de croissance ont ainsi été définies chez l'être humain et le mouton en comparant ces paramètres mesurés aux poids des fœtus et au poids de naissance. Une fois le retard de croissance établi, la gestion médicale des cas peut être adaptée au besoin (Greenwood et al., 2002; Marsal, 2002). Le problème lié à la gestation chez les grands animaux est qu'il n'est pas toujours possible d'obtenir ces mesures du fait de la dimension de l'utérus gravide, de la position du fœtus, ou de la taille des os. Reef et ses collaborateurs en 1996 ont mesuré le diamètre aortique systolique à la base du cœur ainsi que la profondeur du thorax comme marqueurs éventuels de la taille du fœtus équin; le diamètre aortique était le seul paramètre corrélé au poids du poulain à la naissance.

Ce paramètre a également été utilisé par Heyman et ses collaborateurs en 2002 chez le bovin afin d'évaluer les gestations de clones et les gestations normales. Dans cette étude, les auteurs ont trouvé une corrélation significative entre le jour de la gestation et le diamètre aortique chez les fœtus clonés et les fœtus utilisés en tant que contrôle. Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre le diamètre aortique chez les veaux clonés et les veaux utilisés comme contrôles même si il y avait une différence importante du poids à la naissance dans les deux groupes (53 kg et 44 kg respectivement). Takahashi et ses collaborateurs en 2001 ont démontré une corrélation linéaire entre la largeur (prise à mi-hauteur) du métacarpe ou du métatarse fœtal et le poids des veaux à la naissance lors de gestations normales. Les dimensions du métacarpe et du métatarse étaient également bien corrélés au degré de difficulté de vêlage chez des veaux issus d'insémination artificielle. Les mêmes auteurs ont utilisé la largeur du métacarpe ou métatarse par ultrasonographie transrectale après avoir déterminé la présentation du fœtus afin de pouvoir mieux prédire le syndrome du gros veau lors de gestations issues de clonage (Takahashi et al., 2005). Ces deux études ont clairement indiqué que ce paramètre échographique pouvait être inclus dans un profil biophysique fœtal afin de pouvoir mieux détecter et anticiper le syndrome du gros veau de même que les dystocies en fin de gestation, à condition que les membres du veau soient palpables à l'examen transrectal.

D'autres paramètres ont également été suggérés comme marqueurs de croissance fœtale, mais partiellement validés, tels que la taille du globe oculaire fœtal, la diamètre bipariétal fœtal et la longueur du fémur fœtal (Pantaleon et al., 2003). Bertolini et ses collaborateurs en 2002 ont démontré que le diamètre globe oculaire fœtal et la surface de l'orbite du fœtus étaient des moyens utiles pour évaluer la croissance fœtale. Les mêmes auteurs ont également utilisé la longueur du membre antérieur (de la portion proximale de la scapula aux onglons) et la longueur de l'humérus comme marqueurs potentiels de la croissance du fœtus bovin, mais ces paramètres ne pouvaient être mesurés après 100 jours de gestation. En outre, le diamètre du globe oculaire fœtal semblait de valeur limitée après 130 jours de gestation puisque la croissance oculaire est réduite dans la deuxième moitié de la gestation (Bertolini et al., 2002).

Même si les paramètres précédents permettent de déterminer si le fœtus a une croissance adéquate, la croissance est différente de la maturité fœtale. Évaluer si le veau est totalement adapté à la vie extra-utérine est d'une importance capitale afin de prédire le devenir du fœtus. L'endocrinologie fœtale est un outil prometteur afin d'évaluer la maturité fœtale ainsi que son bien-être. Matsuzaki et Shiga en 2002 ont montré que les fœtus issus du clonage n'avaient pas une augmentation pré-partum de leur cortisolémie, ce qui entraînait une incapacité à initier le changement à un mode de sécrétion adulte du facteur de croissance pseudo-insuline (insuline-like growth factor IGF) et une incapacité à induire la parturition spontanée. Une discussion détaillée de ce sujet est cependant en dehors des limites du sujet de notre étude qui ne s'intéresse pas aux interactions hormonales entre le fœtus, l'utérus et la mère.

1.3 Hypothèses et Objectifs de l'étude

Par conséquent, on voit qu'il manque d'études objectives permettant d'évaluer la santé du fœtus bovin dans le dernier tiers de gestation. Cependant, la plus large diffusion de technologies de reproduction assistées et les problèmes associés avec la production *in vitro* d'embryons et en particulier des embryons issus de clonage somatique (syndrome du gros

veau, hydro-allantoïde, détresse respiratoire, anomalies congénitales) mettent la lumière sur la nécessité de mieux prédire précocement la souffrance et les anomalies fœtales. Les résultats obtenus chez les autres espèces (homme, cheval, mouton) suggèrent que l'évaluation de la fréquence cardiaque fœtale, la taille moyenne des placentomes et l'épaisseur de la membrane amniotique devraient être inclus dans un éventuel profil biophysique bovin. Cependant, des études spécifiques sont nécessaires afin de permettre une meilleure compréhension de la fin de la gestation bovine.

1.3.1 Hypothèses de l'étude

Notre hypothèse initiale était que l'évaluation ultrasonographique transabdominale du fœtus en fin de gestation était possible chez le bovin et que sa réalisation pouvait être décrite de façon à pouvoir aborder l'examen ultrasonographique fœtal d'une vache gravide de façon systématique.

Notre seconde hypothèse était que cet examen non invasif du fœtus et de ses annexes, lorsqu'il est réalisé en fin de gestation chez la vache pouvait apporter des informations utiles pour le clinicien en relation avec le devenir du fœtus après sa naissance.

1.3.2 Objectifs de l'étude

L'objectif principal de cette étude était donc de pouvoir dans un premier temps décrire la technique d'examen ultrasonographique transabdominal en fin de gestation chez le bovin afin d'évaluer les différents paramètres fœtaux ou annexiels lors de gestations issues de clonage de cellules somatiques de gestations à risque suite à une maladie maternelle et de gestations contrôles issues de saillie naturelle ou d'insémination artificielle.

Le second objectif de cette étude était de comparer les différents paramètres obtenus en fonction du type de gestation (gestation normale, gestation à risque suite à une maladie maternelle, gestation de clone) et également en fonction du poids et du devenir des fœtus examinés.

Chapitre 2 : Méthodologie

2.1 Animaux utilisés

2.1.1 Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal chez une cohorte de 10 gestations de clones

Les 10 taures de race Holstein porteuses de clones issus de taureaux Holstein ayant servis à cette première étude étaient différentes des animaux porteurs de clones de la seconde étude. L'examen ultrasonographique des gestations chez ces animaux s'est déroulé pour 9 cas à 255 jours post fécondation et pour 1 cas à 220 jours post fécondation. Le même jour de l'examen ultrasonographique, les conditions corporelles des mères porteuses étaient notées. De plus une prise de sang coccygien était alors effectuée chez les taures afin d'être soumise à une analyse hématologique et un profil biochimique complet.

2.1.2 Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal bovin en fin de gestation lors de gestations normales, à risque ou issues de clonage de cellules somatiques

Les animaux utilisés dans cette seconde étude étaient différents de ceux décrits dans la première étude. Les examens ultrasonographiques de fin de gestation ont été effectués lors de 10 gestations contrôles (gestations issues d'insémination artificielle), de 10 gestations à risque et de 10 gestations issues du clonage de cellules somatiques. Les gestations à risques étaient des vaches référées au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire suite à une maladie grave pouvant compromettre leur devenir ainsi que celui de leur fœtus. Afin de pouvoir comparer toutes les données obtenues, l'examen ultrasonographique s'est effectué dans les 10 jours précédents la naissance. La naissance s'est effectuée 24 heures après l'injection de dexaméthasone (Dexaméthasone 5, Vétoquinol, Lavaltrie, Qc) 25 mg, IM par une césarienne chez les animaux contrôles ou portant des clones. La naissance s'est déroulée naturellement ou grâce à une césarienne dans le groupe des gestations à risque.

2.2 Méthodologie générale et technique d'évaluation ultrasonographique transabdominale du fœtus et de ses annexes

L'évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal a été effectuée de la même façon dans les deux études présentées dans les articles ci-après. Pour ce faire, le fœtus était senti par ballottement de l'abdomen afin de confirmer que la gestation occupait majoritairement la portion ventrale de l'abdomen droit. L'abdomen droit était ensuite tondu à l'aide d'une tondeuse chirurgicale lame 40 sur une aire s'étendant ventralement à une ligne passant par la mi-hauteur du fémur et de l'épaule. La zone était rasée crânialement jusqu'au niveau de l'appendice xiphoïde et caudalement jusqu'au pis. La zone tonduée était également prolongée jusqu'à un travers de main à gauche de la ligne blanche.

2.2.1 Évaluation du fœtus

L'examen ultrasonographique s'est déroulé pour une durée d'environ 30 minutes à l'aide d'une sonde sectorielle de 3.5 MHz (Aloka 1700, Tokyo, Japon). La zone préalablement tonduée était humidifiée avec de l'eau tiède puis du gel échographique y était appliqué afin de favoriser l'obtention d'images de bonne qualité. Les critères notés durant l'examen transabdominal étaient compilés sous forme d'une fiche correspondant à chaque animal. Le format de cette fiche est indiqué en annexe 1. Ainsi, après avoir reconnu la cavité thoracique du fœtus, une mesure de la fréquence cardiaque fœtale était prise. Un total de 3 à 5 valeurs de fréquences cardiaques fœtales était obtenu, avec au moins 5 minutes d'intervalle entre chaque mesure. Les fréquences cardiaques fœtales étaient également mesurées si possible avant et après une série de mouvements fœtaux. L'aorte thoracique était également recherchée afin de pouvoir effectuer une mesure du diamètre systolique aortique. Un maximum de 3 mesures était ensuite enregistré et une valeur moyenne du diamètre aortique était notée.

Les mouvements fœtaux observés consistaient le plus souvent en des mouvements des membres qui étaient observés passant brièvement à l'écran lors de la réalisation de l'examen ultrasonographique. Des mouvements du tronc et du thorax étaient également observés de façon périodique. Ils consistaient en une ondulation autour de l'axe longitudinal du fœtus, une rotation complète autour de l'axe longitudinal du fœtus ou bien en des mouvements dont il était difficile de définir la nature. C'est pourquoi du fait de notre incapacité à pouvoir décrire constamment avec précision quelle portion du fœtus était mise en mouvement et quel type de mouvement était observé, l'évaluation des mouvements fœtaux au cours de ces deux études s'est effectuée selon la même échelle de score (de 0 à 3) que celle développée en médecine équine par Reef et ses collaborateurs en 1995. Ainsi les fœtus ne bougeant pas durant la totalité de l'examen se voyaient attribués un score de 0. Les fœtus démontrant une activité pendant moins de 33% de la durée de l'examen se voyaient attribués un score de 1. Les fœtus démontrant une activité pendant plus de 33% du temps d'examen mais pendant moins de 67% du temps d'examen se voyaient attribués un score de 2. Enfin les fœtus actifs plus de 67% du temps ou sans aucune période d'accalmie pendant l'ensemble de l'examen se voyaient attribués un score de 3.

2.2.2 Évaluation ultrasonographique des annexes fœtales

L'évaluation du placenta s'est effectuée de façon identique dans tous les cas. En fonction de la position du fœtus et de l'utérus, la surface de contact entre la paroi abdominale et l'utérus était alors divisée en 4 quadrants comme précédemment mentionné par Reef et ses collaborateurs (1995). Deux quadrants craniaux (droit et gauche) ainsi que deux quadrants caudaux (droit et gauche) étaient ainsi obtenus (Figure 5). Le placentome le plus facile à observer dans chacun des quadrants était alors utilisé afin de calculer sa surface. Puis la valeur moyenne de la surface des 4 placentomes était alors obtenue.

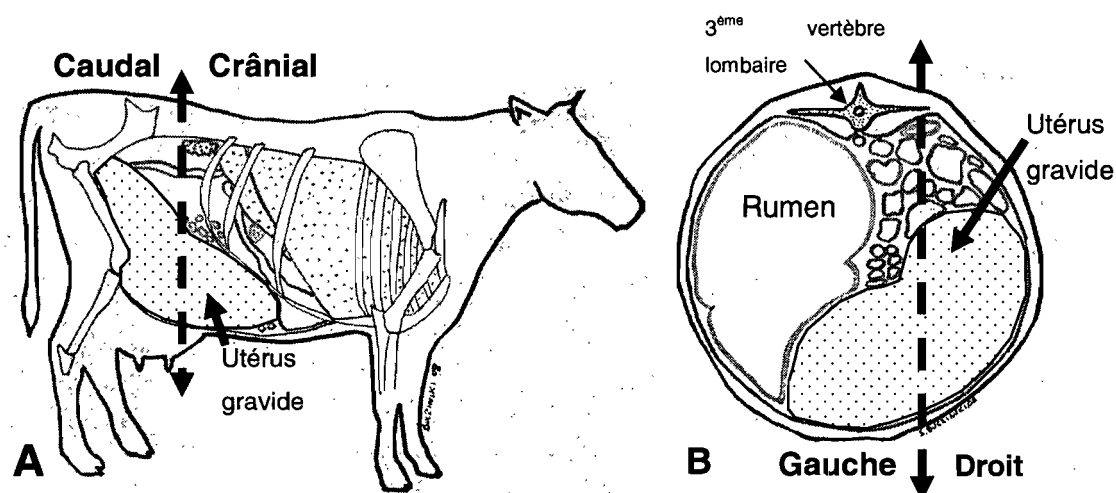


Figure 5 : représentation schématique des 4 quadrants utérins arbitrairement définis (par l'axe en pointillé) lors de l'évaluation ultrasonographique transabdominale de l'utérus gravide chez la vache au cours du 3^{ème} tiers de gestation. A. Représentation de la topographie abdominale d'une vache gestante de 8 mois vue latérale droite. B. Représentation schématique de la topographie abdominale d'une vache gestante de 8 mois. Vue en coupe transversale au niveau de la 3^{ème} vertèbre lombaire.

Modifié d'après Barone, 2001. In : Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Planches 364 et 368.

La profondeur maximale des liquides utérins était également notée au cours de l'examen. En outre, l'échogénicité des liquides amniotique et allantoïde était également noté de 0 à 3 en fonction de leur échogénicité (0 anéchogène à 3 hypoéchogène avec de nombreuses particules échogènes observées continuellement pendant l'examen).

2.2.3 Évaluation du devenir des gestations et des veaux nouveaux-nés

Les données concernant le devenir de la gestation étaient également notées sur chaque fiche. Ainsi la date du vêlage et le nombre de jours de gestation étaient compilés. Le devenir du veau ainsi que le type de soins qu'il nécessitait (réanimation cardiorespiratoire,

administration d'oxygène intra-nasal, ventilation mécanique) était également notés. La mortalité et la morbidité des veaux étaient également notées durant le premier mois de vie. Ensuite en fonction des deux articles présentés, de légères différences concernant les protocoles étaient notées mais sont présentées plus en détail des paragraphes suivants qui suivent.

2.3 Spécificités de chacune des deux études effectuées.

2.3.1 Évaluation ultrasonographique du bien être fœtal chez une cohorte de 10 gestations de clones

L'évaluation ultrasonographique était réalisée de la façon préalablement décrite. La surface du placentome était évaluée comme étant proche de celle d'un rectangle et calculée par la relation $S = \text{Longueur} \times \text{Largeur}$. Pour chaque gestation une surface placentaire moyenne était obtenue en tenant compte de chacun des placentomes mesurés dans chacun des quadrants utérins.

Le plan initial était d'induire la mise-bas à l'aide d'une injection de dexaméthasone (Dexaméthasone 5, Vétoquinol, Lavaltrie, Qc) 25 mg, IM, puis de pratiquer une césarienne 24 heures après l'injection de la dexaméthasone. Le but était de pouvoir mieux gérer les naissances et les interventions chirurgicales en planifiant d'effectuer les césariennes aux jours 276, 278 et 279 post-fécondation. Néanmoins, différents événements ont empêché d'effectuer cette répartition des naissances comme mentionné dans le premier article.

2.3.2 Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal bovin en fin de gestation lors de gestations normales, à risque ou issues de clonage de cellules somatiques

L'examen ultrasonographique s'est déroulé de la même façon que précédemment décrit. Le calcul de la surface des placentomes était néanmoins légèrement différent. Du fait que la

surface du placentome est plus proche de celle d'une ellipse que de celle d'un rectangle, le calcul de la surface placentaire est mieux approchée par le calcul de surface (S) $S = \pi \times (\text{Longueur} \times \text{Largeur}) / 4$ (Batchelder et al., 2007). De même la surface du plus grand placentome obtenue, la longueur maximale et la largeur maximale des placentomes obtenus étaient également notées pour pouvoir les comparer en fonction des gestations et d'autres études récemment réalisées (Kohan-Ghadr et al., 2008; Heyman et al., 2002).

2.4 Analyses statistiques des deux études

2.4.1 Évaluation ultrasonographique du bien être fœtal chez une cohorte de 10 gestations de clones

Du fait du peu d'animaux utilisés dans cette étude et de l'absence de groupe contrôle. Seule une étude descriptive des données obtenues a été réalisée.

2.4.2 Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal bovin en fin de gestation lors de gestations normales, à risque, ou issues de clonage de cellules somatiques

Les analyses statistiques qui ont été utilisées dans cette seconde étude ont été effectuées à l'aide du logiciel d'analyses statistiques (SAS, version 9.1). Un test de t a été utilisé afin de pouvoir comparer chacun des paramètres quantitatifs suivants : l'intervalle examen ultrasonographique-naissance, la fréquence cardiaque fœtale moyenne, la surface moyenne des placentomes, la surface maximale des placentomes, la longueur et la largeur maximale des placentomes en fonction du devenir des fœtus (ceux mort dans la période péripartum ou ceux survivants) ainsi qu'en fonction du devenir des veaux vivants (ceux développant des degrés divers de détresse respiratoire ou ceux sans problème de ce type). Un test du Chi-carré a été utilisé afin de comparer les paramètres qualitatifs (activité fœtale, score

échographique des liquides fœtaux et profondeur maximale des liquides fœtaux) avec le devenir des veaux (mortalité et problèmes respiratoires).

Une association entre la fréquence cardiaque fœtale et l'activité fœtale a été investiguée grâce à un modèle de régression linéaire en utilisant l'activité fœtale comme facteur fixé. Un modèle de régression linéaire a également été utilisé pour documenter la relation entre le diamètre aortique thoracique et le poids des veaux à la naissance.

Les données quantitatives ont également été comparées dans chacun des groupes de gestations (contrôle, à risque, ou issues de clonage) en utilisant un modèle linéaire.

Chapitre 3 : Articles

3.1 Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal chez une cohorte de 10 gestations de clones

Article accepté, sous presse, dans la Revue Vétérinaire Canadienne / Canadian Veterinary Journal.

Fetal well-being assessment, neonatal and postpartum findings of cloned pregnancies in cattle: A preliminary study on 10 fetuses and calves.

Buczinski S, Fecteau G, Comeau G, Boysen SR, Lefebvre RC, Smith LC.

Département des Sciences Cliniques

Centre de Recherche en Reproduction Animale

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal,

3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec

J2S 7C6.

Article accepté pour publication au Canadian Veterinary Journal le 02 octobre 2008.

Abstract

Cloned pregnancies in cattle are considered to be at risk due to a variety of fetal or adnexal abnormalities. Data is lacking concerning the possibility of transabdominal ultrasonography in the assessment of these highrisk pregnancies. Transabdominal ultrasonography has rarely been reported in the assessment of bovine cloned pregnancies. Ten Holstein heifers carrying 8-month-old cloned fetuses were assessed by transabdominal ultrasonographic examination during the 3rd trimester of pregnancy. Fetal heart rates (FHR), movements, adnexal appearance, and placentome size were recorded. The outcome of the pregnancies was also noted and potential indicators of fetal demise recorded. Survival rate 1 week after birth was 30%. Mean FHR was 113 beats per minute (range from 92 to 128 bpm) during the fetal ultrasonography. No correlation between FHR and fetal activity was found. Fetal hyperactivity and imaging of hyperechoic particles in both allantoic and amniotic fluids were possible signs of fetal distress. Despite the size of the fetus and the deep bovine abdomen, fetal transabdominal ultrasonography can be performed in cattle. This preliminary study points to the necessity of further larger studies for defining normal and abnormal findings in bovine late pregnancy.

Résumé

Les gestations issues de clonage sont considérées à risque du fait de différentes anomalies fœtales ou annexielles. L'utilisation de l'examen échographique transabdominal dans l'évaluation de ces gestations à risque est peu utilisée chez les bovins. Dix taures Holstein gestantes de 8 mois de fœtus issus de clonage somatique ont été évaluées avec un examen échographique transabdominal durant le 3^{ème} trimestre de gestation. Les fréquences cardiaques fœtales, les mouvements fœtaux, l'apparence des annexes et la taille des placentomes ont été notées. Le devenir des gestations a également été recueilli ainsi que les indicateurs potentiels d'une souffrance fœtale. Le taux de survie, une semaine après la naissance était de 30%. La fréquence cardiaque fœtale moyenne était de 113 battements par minute (extrema de 92 à 128 battements par minute). Il n'y avait pas de corrélations entre la fréquence cardiaque fœtale et le mouvement du fœtus. L'hyperactivité fœtale et la visualisation d'une grande quantité de particules hyperéchogènes au sein des liquides amniotique et allantoïde ont été identifiées comme signes possibles de détresse fœtale. Malgré la taille du fœtus et la profondeur de l'abdomen maternel, l'échographie transabdominale fœtale peut être réalisée chez la vache. Cette étude préliminaire devra être confirmée par d'autres pour définir précisément les trouvailles normales et anormales de la fin de gestation bovine.

Introduction

Cloning is arguably one of the most important discoveries of modern biology. Somatic cell cloning has been described in sheep (1), goats (2), pigs (3), cattle (4), horses (5), cats (6), and, recently, dogs (7). In ruminants, successful cloning has been achieved, using different techniques (8-15). Cloning and other *in vitro* manipulations of early stage embryos are associated with important losses at different stages of pregnancy (10,15-20). Cloned calves also have a higher rate of neonatal mortality than do normal calves or *in vitro* produced calves (8,11,21). Various abnormalities of newborns and their adnexa (hydrallantois) have been described (8,11,17,18,21). The large offspring syndrome (LOS) appears to be the most common anomaly and its precise etiology remains uncertain (22,23). Underdevelopment of the placenta during the 1st trimester and compensatory overgrowth of the remaining placentomes is a possible explanation (11,19,21,24). The most challenging task in cloning cattle is to reduce fetal mortality, neonatal abnormalities, and recipient diseases by early assessment and recognition of fetal distress, allowing for strategic intervention (20,21,25).

Although limited data are available on the evaluation of the nearterm bovine cloned fetus, some reports have focused on ultrasonographic assessments that describe fetal heart rate (FHR), aortic diameter, and morphological aspects of fetal adnexa (17,18,26). Fetal movements, a reliable predictor of fetal well-being in other species, have not been studied in cattle (27-29). Although the fetal biophysical profile has not been described and validated in cattle until now, normal and abnormal pregnancy findings have been described in horses and used to establish an equine biophysical profile (27,28).

The objective in reporting the results of this preliminary study is to describe the ultrasonographic findings in a cohort of nearterm, bovine cloned pregnancies. Clinical and pathological findings, ultrasonographic observations of bovine cloned pregnancies, and the outcome of the pregnancies are described.

Materials and methods

All blastocysts were produced *in vitro* by somatic cell nuclear transfer, using donor skin fibroblasts derived from 3 mature Holstein bulls and host oocytes derived from

slaughterhouse-derived Holstein ovaries. Recipients were healthy Holstein heifers that had a synchronization for embryo transfer, 8 days after estrus. All recipient heifers were housed in tie stall barns and fed hay *ad libitum* and concentrate (2 kg per day).

Pregnancy monitoring

The ultrasonographic protocole was previously accepted by the institutional animal care committee (Comité d'Éthique et d'Utilisation des Animaux). An ultrasonographic assessment of the near-term fetus and uterus was performed by transabdominal ultrasonography, using a 3.5 MHz sector probe (Aloka 1700, Aloka, Tokyo, Japan). The examination lasted approximately 30 min. The fetal heart rate (FHR) was measured 3 to 5 times at 5-minute intervals. Initially, the fetal respiratory movements were observed, but, eventually, this parameter was abandoned since it was impossible to obtain reliable information. The pregnant uterus was divided into 4 quadrants (left and right cranial, left and right caudal). The maximum length and width of the easiest placentome to measure from each quadrant was obtained, allowing the estimation of an arbitrary surface area for each placentome (width×length), considering a near rectangular form of the placentome. A mean placentome surface area was obtained by using the 4 measurements. The fetal activity during the examination period was graded from 0 to 3, using the scale developed previously in equine studies (27,28). Fetal activity was graded 0 if no movement was detected, 1 if only a few movements were detected (showing activity for less than one third of the examination period), 2 if the fetus was fairly active (showing activity for more than one third but less than two thirds of the examination period), 3 if the fetus was very active (showing activity for more than two thirds of the examination period, almost consistently active). The difficulty in visualizing the entire fetus made it impossible to specify the type of movement or the complexity of the fetal activity. The maximal depth of allantoic or amniotic fluid and its echogenicity were also noted in order to be able to eventually detect oligohydramnios by decreased fluid accumulation (29). This maximal depth of amniotic or allantoic fluid was determined during the examination at the site where the maximum quantity of allantoic or amniotic fluid was observed. This measurement was independent of

the position of the fetus. The amniotic fluid was easily identified by its relatively higher echogenicity compared with that of allantoic fluid, which is almost anechoic (27,28). An echogenicity scale was also used to assess fetal fluid based on published reports for the horse (27,28). The fetal fluids were graded 0 if they were anechoic, 1 if only a small amount of echogenic particles were detected, 2 if a moderate number of echogenic particles were observed, and 3 if echogenic particles were present continuously throughout the examination. Any suspected anomaly was also recorded during the ultrasonographic examination.

On the day of assessment, recipient whole blood samples were collected and submitted for a serum biochemical profile and a complete blood cell count (CBC). The body condition score of the heifers was also estimated, using a scale from 0 to 5 (30).

Calving procedures

The initial plan was to induce parturition by administering dexamethasone (Dexamethasone 5, Vétoquinol, Lavaltrie, Quebec), 25 mg, IM, 24 to 36 h prior to the day of cesarean section, in order to decrease the occurrence of neonatal respiratory distress (31). The injections were spread over 3 d to permit 3 cesarean sections per day at 276, 277, and 278 d gestation. Cesarean sections and neonatal care were performed at the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) de l'Université of Montréal.

Macroscopic abnormalities of the placentomes (reduced number, increased size, or edema) were recorded during the cesarean section. Cloned calves were examined promptly after birth to assess respiratory function. Neonatal care was based on the initial clinical assessment. Nasal and pharyngeal secretions were removed by suction, and cold water was applied to the neck and in the ears. The FHR and rhythm were then assessed. If persistent bradycardia (less than 80 beats/min) and/or bradypnea (less than 10 breaths/min) were observed, respiratory assistance was provided (first, with intranasal oxygen; then, after orotracheal intubation, by manual or mechanical ventilation). Umbilical care included disinfection with a 5% iodine tincture solution every 2 h until the umbilicus was dry. Frozen colostrum from healthy donor cows was offered to the calves within 2 h of birth. A

serum biochemical panel was performed on days 1 and 2 to assess passive immunity transfer by checking total proteins, albumin, globulin, and gamma-glutamyl transferase activity values. The feeding schedule consisted of administering 2 L of whole milk, by bottle, every 8 h. Orogastric intubation was used if the calf failed to nurse on its own (1L, q4-6 h). Clinical assessment of the calf was repeated on 15 min if cardiorespiratory parameters were abnormal or respiratory assistance was required, then q 1 h for 24 h and then q 12 h when the animal was considered stable. Antimicrobial drugs were administered if sepsis was suspected, and dextrose-containing fluids were administered if blood glucose levels were < 4 mmol/L. Animals were discharged when they were standing and nursing independently, had normal vital signs, and further hospital care was no longer considered necessary. Dead calves and fetuses were submitted for postmortem examination. Abnormal organs were sampled and histologically examined. All medical complications occurring during the first 6 mo of life were recorded and the survival rate at 1 y was obtained.

Results

At the day of the ultrasonographic examination, 9 heifers carrying freshly transferred cloned embryos were confirmed to be pregnant at day-255; 1 heifer carrying a frozen-thawed cloned embryo was confirmed at day-220. Some complications developed prior to the expected calving date. Heifer # 1 had severe abdominal distension, weakness, and premature rupture of the fetal membranes on 227 d of pregnancy. The diagnosis was hydrallantois and the fetus was dead. She was euthanized.

Heifers # 6 and 8 were referred to the veterinary hospital for poor general status and suspected hydrops on day 255 of pregnancy.

Heifers # 3, 4, and 7 were hospitalized on days 266, 265, and 264, respectively of pregnancy for premature rupture of the fetal membranes and early parturition.

Heifers # 2, 5, 9, and 10 had induced parturition, according to the defined protocol, and cesarean sections performed at the veterinary hospital at 278, 278, 279, and 277 d gestation, respectively.

Health status of the heifers during the ultrasonographic fetal assessment

The recipients' body score (BS) at examination is presented in Table 1. The median BS was 3.0 (range 2.75 - 3.25). Increased levels of beta hydroxy-butyrate (BHB) (n=5), hyperfibrinogenemia (n=6), and lymphopenia (n=3) were the most commonly encountered abnormalities. Heifers with increased levels of BHB were administered propylene glycol, 250 mL/heifer, PO, q 12 h until the day of calving. Hypoglycemia and a high concentration of BHB (>3000 $\mu\text{mol/L}$) occurred in heifers # 7 and 8. Both heifers had premature delivery and hydrallantois, and their fetuses died. All heifers with an elevated anion gap delivered either a dead fetus or a calf that died shortly after birth.

Ultrasonography on the farm

The results of the transabdominal ultrasonographic examination are summarized in Table 2. The examination was performed easily without sedation. Imaging of the fetal thorax was possible on the 1st attempt in 7 cases. In 3 cases, a 2nd examination was necessary.

The mean FHR at 255 d of pregnancy was 113 beats/min (range 106 to 130 beats/min). It was not possible to associate fetal activity with increased FHR. Fetal activity was always observed throughout the examination. There was no detectable sleeping phase during the entire examination time. Fetuses were considered active for less than one third of the total examination time in 7 out of 10 cases. Two fetuses (carried by heifers # 3 and 8) were moving consistently during the examination and were allocated a score of 3 for fetal activity; both had negative outcome (Table 2).

The maximal depth of uterine fluids was highly variable ranging from 6.2 cm to more than 20 cm. The fetus with the smallest depth of uterine fluid (in heifer # 2) had serious cardiorespiratory problems at birth. Echogenicity of allantoic and amniotic fluid was considered normal (score of 1) in 7 out of 10 cases. Moderate hyperechoic particles (score of 2) were detected in the fetal fluid of heifer # 6 (score of 2), and high number of hyperechoic particles (score of 3) was seen in 2 cases (heifers # 1 and 8). Both cases with the echogenicity score of 3 were diagnosed with hydrallantois and their fetuses died.

Measurement of the thickness of the amniotic membrane showed important differences between normal pregnancies (0.8 to 1 cm (heifers # 4 and 6) and those with hydrallantois (2

cm (heifer #8) (Table 3)). The mean estimated placentome surface was 35 cm^2 (range from 22 to 45 cm^2). In heifer # 10, ascites was observed in the fetal abdomen; fetal anasarca was diagnosed and confirmed at the time of the caesarean section.

Evolution of the pregnancies

Heifer # 1 was diagnosed with hydrallantois, aborted on day 250, and was euthanized. Heifers # 4, 6, and 8 were referred to the CHUV on day 255 because of a decrease in appetite and abdominal distension. Their body condition had deteriorated since the 1st examination (Table 3) and they were profoundly depressed. Heifer # 4 was recumbent, and in heifer # 6, the serum biochemical profile indicated an elevation of BHB concentration levels and an increase in gamma glutamyl-transferase (GGT) activity (46 IU/L, reference range, 0 to 39 IU/L) and a presumptive diagnosis of hepatic lipidosis was made. Heifer # 8 had a distended uterus with no palpable placentome or fetus upon transrectal examination. The initial treatment included continuous IV fluid therapy (dextrose 2.5% and NaCl 0.45%, 20 L per day) combined with insulin injections (200 IU, SC, q48h). All 3 heifers had repeated abdominal fetal ultrasonographic examinations (Table 3). The FHRs at subsequent examinations were not significantly different from those at the 1st examination. An interesting feature was observed in heifer # 8: its amniotic membrane separating the amniotic and allantoic fluid appeared thickened and measured 2.0 cm; it was thicker than in heifer # 4 (1.0 cm) and heifer # 6 (0.8 cm), which did not have hydrallantois. The amniotic and allantoic fluids had an echogenicity of 2 in all 3 cases. The fetal activity was observed during 33% to 66% of the examination time, leading to a score of 2 in all 3 cases. Parturition was induced to allow a cesarean section to be performed on day 267 for heifer # 6 and on day 268 for heifers # 4 and # 8.

Heifer # 6 delivered a 48 kg calf with enlarged umbilical structures. The calf experienced respiratory difficulties with persistent bradycardia (40-50 beats/min at birth to 25 beats/min 10 min after birth), so mechanical ventilation was initiated, after propofol induction (Rapinovet, Schering-Plough, Pointe-Claire, Quebec) 5 mg/kg BW, IV, to avoid the calf's resistance to mechanical ventilation. Auricular arterial blood gas (ABG) analysis revealed

an increased PaCO₂ (70 mm Hg, reference interval 40 to 45 mm Hg), hypoxemia (PaO₂=52 mm Hg, reference interval 80 to 100 mm Hg)), and hyperglycemia (15 mmol/L, reference interval 5 to 9 mmol/L). Response 2 h after initiation of assisted ventilation (Esprit ventilator, Respironics Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA) were good, with a decrease in the PaCO₂ (55 mm Hg) and an increase in the PaO₂ (156 mm Hg) values. Twelve hours after birth, the level of anesthetic was decreased to avoid the negative effects of long-term anesthesia (anorexia and ileus). A deterioration of respiratory function, based on results of repeated blood gas analysis, was observed. The deterioration in respiratory function was believed to be associated with the calf's resistance to mechanical ventilation. The calf was euthanized 20 h after birth on account of the poor prognosis. Necropsy revealed a subacute pneumonic aspiration of amniotic fluid.

Heifer # 4 delivered its calf on day 268. The calf was tachypneic and tachycardic. Umbilical structures were grossly enlarged. Thoracic wall movements were superficial and the calf was considered to be in respiratory distress. A bolus of 10 mg/kg BW-bolus of caffeine was administered, PO, without success. Manual assisted ventilation was initiated following orotracheal intubation. The partial pressure of arterial CO₂ decreased temporarily, but it increased as soon as ventilation was terminated. The calf was then ventilated mechanically, after induction with propofol, 5 mg/kg BW, IV. Initially, the calf responded well to mechanical ventilation and showed a normal ABG analysis after 2 h of ventilation. Ten hours later the mechanical ventilation was stopped, whereupon the calf condition and it was euthanized. Necropsy revealed a subacute pneumonic aspiration of amniotic fluid, congenital hepatic portal fibrosis, and left ventricular hypertrophy.

The calf out of heifer # 8 was delivered by cesarean section on day 268. The uterus was distended and hydrallantois was suspected. Placentomes were reduced in number, large and edematous. The calf was bradyarrhythmic (fewer than 20 beats/min) and severely dyspneic; it died shortly after birth. Necropsy revealed lesions compatible with a subacute pneumonic aspiration of amniotic fluid, and hepatocyte vacuolization.

Heifers # 3 and 7 were referred to the CHUV after immediately the owner observed premature rupture of the fetal membranes on days 264 and 266, respectively. Heifer # 3 was delivered of a large dead fetus (66 kg) via cesarean section. The placenta was hemorrhagic. Necropsy findings included multiple nodules in the liver and histologic lesions compatible with congenital hepatic fibrosis, myocardial degeneration, and moderate pneumonia, secondary to chronic aspiration of amniotic fluid due to fetal distress. The surgery performed on heifer # 7 revealed large edematous placentomes and an increased amount of allantoic fluid compatible with hydrallantois. The fetus was dead. Necropsy findings included a subacute pneumonia secondary to chronic aspiration of amniotic fluid.

Deliveries with no obvious disease of the dam

In 4 heifers # 2, 5, 9, and 10, parturition was induced in order to perform the cesarean sections on days 278 and 279. Heifer # 10, carrying a fetus with suspected anasarca, ruptured her fetal membranes prematurely on day 277 and a cesarean section was performed immediately. A large dead bulldog calf was delivered with at least 10 L of ascites and a swollen face compatible with fetal anasarca.

Heifer # 5's calf was born on day 278. Six hours after birth, analysis of ABG, sampled via an auricular catheter, revealed hypercapnia ($\text{PaCO}_2=63$ mmHg) and hypoxemia ($\text{PaO}_2=54$ mmHg). The respiratory rate was elevated (from 70 to 100 breaths/min). Thoracic radiographs showed a mixed interstitial and alveolar pattern in the lungs. Intranasal oxygen was given for 24 h (6 L/min). Two hours after initiating the oxygen therapy, the respiratory function markedly improved. The oxygen therapy was progressively reduced on day 2 without any deterioration of the calf's respiratory condition. The rectal temperature increased (from 39°C to 40.3°C) on day 2 and remained elevated despite treatment with flunixin meglumine, (Banamin, Schering-Plough, Pointe-Claire, Quebec), 1 mg/kg BW, IV, q 24 h. The rectal temperature returned to normal on day 4. The calf was discharged on day 5.

Heifer # 2's calf was delivered by cesarean section on day 278 and weighed 56 kg. Initial respirations were spontaneous, but they rapidly became superficial and labored. The venous

blood gas, taken 30 min after birth, showed hypercapnic acidosis (pH=7.08 (reference interval 7.35 to 7.45); PvCO₂=77 mm Hg (reference interval 35 to 47 mmHg); base excess (BE)=-9 mmol/L (reference interval 0 to -6.1)). One hour later, intranasal administration of oxygen was initiated (8 L/min). The calf's condition deteriorated 10 h later with a deterioration of the general condition, and an irregular respiratory pattern. The calf was tachypneic (80 breaths/min) with increased respiratory efforts and was intubated nasotracheally without sedation. Mechanical ventilation was then initiated. The ABG and general condition of the calf improved over the next 10 h. Twenty hours later an ABG analysis revealed a major improvement (pH=7.38; PaCO₂=55 mmHg; PaO₂=294 mmHg; BE=8 mmol/L) in the respiratory function. Mechanical ventilation was continued for 2 d and the calf was weaned progressively from the ventilator on day 4. He was discharged from the hospital on day 6 with instructions to the owner to administer ceftiofur (Excenel, Pfizer, Kirkland, Ontario), 5 mg/kg BW, IM, q 12 h for 10 d.

Heifer # 9's calf was born by cesarean section on day 279. The calf was considered healthy with no detectable abnormalities. He was kept under observation for 3 d and then discharged on day 4.

Evolution of the 3 surviving calves

The 3 calves that were discharged from CHUV did well for 1 wk. During their 2nd week of life, they developed cryptosporidial diarrhea and severe metabolic acidosis that was treated symptomatically. Six weeks later, Heifer # 5's calf developed abdominal distension and severe hypokalemia (1.9 mmol/L, reference range from 3.86 to 5.28 mmol/L) associated with a colocolic intussusception of the spiral colon that was surgically treated with laterolateral anastomosis and resection of the devitalised spiral colon. The calf was discharged after 15 d. The calf was eventually readmitted at 12 wk of age for chronic bloat. A long-term rumen fistula was placed and ceftiofur (Excenel, Pfizer), 1 mg/kg BW, IM, q 12 h was administered for 7 d. The calf then had an uneventful recovery.

Heifer # 2's calf was weak, unthrifty, anemic, and slightly depressed. He was treated symptomatically with IV fluid for 3 d, but he remained depressed. His PCV dropped

progressively (from 0.19 to 0.16 L/L, reference interval: 0.26 to 0.42 L/L). A nonregenerative anemia of unknown origin was diagnosed on the basis of a CBC. The calf progressively deteriorated and died 2 wk later. Multiple perforated abomasal ulcers and severe diffuse peritonitis were diagnosed on postmortem examination. At 1 y of age, calves out of heifers # 5 and 9 were considered healthy. Their semen has been evaluated and considered normal.

Discussion

Somatic cloning techniques are associated with multiple losses throughout pregnancy (13,17,19,21), a majority of which occur in the 1st trimester of gestation (17,32). In the third trimester of gestation, losses have been reported as being 6.2% (17) and the mortality rate in the week 1 of life has been variously reported as 33% (17), 51% (33), or 87.5% (11). The overall mortality rate observed in this study (7 of 10 calves, 70%) was associated with various abnormalities of the dam, the fetus, and/or the placenta.

Abnormal placentation is recognized as an important limiting factor in cloning (4,19,22,32). Decreased numbers of placentomes have characterized the placental insufficiency in the 1st trimester of pregnancy and have been associated with compensated overgrowth of the remaining placentomes (22,32). Placental abnormalities have been associated with fetal fluid anomalies; the exact origin of these anomalies is unknown, but different authors have hypothesized that deficient angiogenesis and allantoic development during placentation may be involved (24,32). In late pregnancy, the most frequently reported abnormality is hydrallantois (11,14,17,22,34,35), as was observed in 30% of the cases in this study. The prognosis for the fetus should be guarded to poor, based on our findings and those in other reports (11,17,20,21).

Large offspring syndrome (LOS) was also diagnosed in this study. Although the exact origin of the LOS remains unknown, large fetuses can have a detrimental effect on their dam as shown by the relatively low body condition of the recipient heifers in this study. An adequate nutrition program is necessary to maintain a normal fetal growth. Maternal protein restriction in early to mid pregnancy in cattle may enhance fetal and placental growth (36).

Large fetuses have more demanding metabolic requirements (37). These high metabolic requirements could have a negative effect on the health status of the dam because of metabolic deviation from the dam toward the fetus (8). Ketosis and hypoglycemia of the dam may have contributed to the poor outcome of the calves (38). Despite the increase in the frequency and amount of feeding and oral propylene glycol treatment instituted for the ketotic heifers, their general condition continued to deteriorate. Other reports have pointed out that dams carrying cloned fetuses may suffer from malnutrition and secondary pregnancy toxemia (8,11). The importance of closely monitoring the nutritional program of dams before the appearance of metabolic disorders is supported by this study.

Various congenital defects have been reported in cloned calves (11,12,17,39,40). Cardiac defects are the most frequent, with left heart failure, right ventricular dilation, and patent foramen ovale being commonly noted (8,11,21,39). Common hepatic defect in cloned calves have consisted of liver congestion, hepatic lipidosis (21,39), and congenital hepatic fibrosis (40). The precise etiology of these various anomalies remains unknown. Interaction between *in vitro* culture media and the early embryo, asynchronies between the uterus of the recipient and the implantation date, mitochondrial DNA interactions or mutation during cell divisions, and genomic imprinting are all potential causes (21,23). A recent study revealed aberrant gene expression in organs of cloned calves that died prematurely (39). The myocardial tissue gene expression was most frequently perturbed, which is concordant with the high rate of heart disorders in cloned calves (39).

Primary respiratory congenital defects are rare in cloned calves; however, respiratory distress is frequent (8,11,20,41). Depending on the study, different factors have been implicated in respiratory distress, including pulmonary hypertension (41), immaturity (11), and pulmonary infection (8). Chronic amniotic fluid aspiration was the most common postmortem diagnosis in this case series. It was suspected that amniotic fluid was aspirated by the fetus for several days prior to birth, as macrophage infiltration was present in the lungs. We believe that this is associated with placental insufficiency and fetal distress. The most common clinical manifestation of respiratory distress was hypercapnic respiratory

failure, which could be due to underexpanded lungs. It was diagnosed in 3 cases and successfully managed by mechanical ventilation in heifer # 2's calf (42).

Other reported anomalies, such as persistent hyperthermia (21,26), anemia (12,21,43), hypoglycaemia (8,21,44), and hyperglycemia (45), were also identified in this study. Although the exact cause of these anomalies remains unknown, an increased circulating blood volume in calves with LOS, without a concurrent increase in the number of red blood cells could explain a relative anemia (43). Endocrine profiles have shown an increase of thyroid hormone in cloned calves (26). This primary hyperthyroidism may could explain hyperthermia via hypermetabolism. Increased insulinemia (8), decreased cortisolemia (46), or variations in insulin growth factors (26,46) could also interfere with carbohydrate metabolism. Due to the various differences between cloned and other calves, it has been suggested that cloned calves be considered physiologically distinct from other calves until 2 mo of age (43).

Ultrasonographic assessment of the conceptus in late gestation provides enlightening information. Although data on bovine fetal well-being is limited, it has been investigated in humans (29) and horses (27,28). However, direct extrapolation of this information to cattle is not possible. In general, the examination technique was easy to perform and well tolerated by the heifers. Parameters that were included were similar to those included in equine biophysical profiles; however, the placentome appears to be the easiest unit to measure, as suggested by previous studies evaluating clone pregnancies (17,26). The mean estimated placentome surface area was larger than previously reported (35 cm^2 in our study vs 27 cm^2) (17). Ultrasonography allowed the early identification of fetal anasarca, which indicates the potential of this technique for early detection of fetal abnormalities. Since this preliminary report emphasizes ultrasonographic assessment of fetal well-being, further studies still have to be performed in normal pregnancies to describe what is a healthy fetus, as well as to assess the repeatability of this noninvasive assesement.

Assessment of fetal movements is limited in cows, because the depth of the maternal abdomen and the large size of the fetus prevent complete ultrasonographic visualization of

the type of movement (47). Therefore, the proportion of time that the fetus was moving over the total observation period was used. All pregnancies in which fetuses obtained a score of 3 (moving more than 66% of the time) were born dead or died within 30 min. No fetus was totally inactive (score of 0). Hyperactivity may represent an abnormal sign and should be included in a bovine fetal well-being profile.

Fetal heart rate variability (FHRV) and fetal movements (FM) are considered important criteria in the assessment of the human fetal well-being (29,48). Fetal heart rate variability is also used to assess fetal well-being in a sheep model of compromised pregnancy (49). Short periods of fetal tachycardia are normal after FM in the bovine or equine species (22,50,51). However, persistent tachycardia or persistent bradycardia is associated with a poor neonatal outcome in the equine and ovine species (50,52). Fetal bradycardia was also an indicator of imminent fetal death in aborting Angora does (53). Mean estimated FHR was not correlated with fetal activity levels in the present study. Continuous FHR recording could be more useful than obtaining 3 to 5 measurements over a 30-minute period, as in this study, since heart rate variability (acceleration and deceleration slopes) and its correlation with fetal movement can then be studied (54).

Reduced maximal depth of fetal fluid was associated with respiratory distress in heifer # 2. This finding may suggest that oligohydramnios is associated with fetal distress, as has been noted in humans and horses (28,29). Therefore, reduction in the quantity of fetal fluid near term in pregnancy should be considered a possible abnormal finding. Echogenic particles in bovine fetal fluids have classically been associated with a severe fetal distress or fetal death (47). Fetal fluid scores of 2 or 3 were associated with a poor outcome (hydrallantois, neonatal mortality, or severe cardiorespiratory distress). Moderate amounts of particulate matter in the fetal fluid should be monitored over time; when they are present, complications should be anticipated.

The measurement of amniotic membrane thickness appeared to be an important criterion in the diagnosis of hydrallantois. This membrane is easily observed between the allantoic and amniotic fluids. The amniotic membrane was thickened in the case of hydrallantois. Edema

of fetal membranes has been noted macroscopically during cesarean-sections performed on cases of hydrops (35,55).

This study confirms the current problems encountered in bovine somatic cloning. These various problems are associated with poor maternal condition, placental anomalies, and various neonatal problems. This is the first attempt to describe a bovine fetal biophysical profile in late pregnancy. The ultrasonographic findings provide information in regard to fetal well-being that appears to be promising for the detection of fetal congenital anomalies, as well as fetal distress. As in other species, the ultrasonographic assessment of late pregnancy in cattle could help the veterinarian to manage high-risk pregnancies.

Acknowledgements

The authors thank the students and veterinary technicians who helped during the cesarean-sections and the management of the neonates.

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:2095-2098.
2. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech* 1999;17:456-461.
3. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000;289:1188-1190.
4. Oback B, Wells DN. Cloning cattle. *Cloning Stem Cells* 2003;5:243-256.
5. Galli C, Lagutina I, Crotti G, et al. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin (letter). *Nature* 2003;424:635.
6. Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002;415:859.
7. Lee BC, Kim MK, Jang G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 2005;4:641.
8. Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 1996;45:141-152.
9. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998;82:2095-2098.
10. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:369-368.
11. Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, et al. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 cases studies). *Theriogenology* 1999;51:1451-1465.
12. Renard JP, Chastant S, Chesné P, et al. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 1999;353:1489-1491.
13. Bordignon V, Keyston R, Lazaris A, et al. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. *Biol Reprod* 2003;68:2013-2023.

14. Mello MR, Caetano HV, Marques MG, et al. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1485-1489.
15. Gong G, Dai Y, Zhu H, et al. Generation of cloned calves from different types of somatic cells. *Sci China. C Life Sci* 2004;47:470-476.
16. Smith LC, Bordignon V, Babkine M, et al. Benefits and problems with cloning animals. *Can Vet J* 2000;41:919-924.
17. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, et al. Frequency and occurrence of late gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 2002;66:6-13.
18. Taverne MAM, Breukelman SP, Perényi Z, et al. The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos. *Reprod Nutr Dev* 2002;42:613-624.
19. Wells DN. Cloning in livestock agriculture. *Reprod Suppl* 2003;61:131-150.
20. Fecteau ME, Palmer JE, Wilkins PA. Neonatal care of high-risk cloned and transgenic calves. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 2005;21:637-653.
21. Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Renard JP. Clonage et pathophysiologie de la gestation associées. *Gynecol Obstet Fertil* 2000;28:633-642.
22. Wilson JM, Williams JD, Bondioli KR, et al. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning) embryo transfer and natural mating. *Anim Reprod Sci* 1995;38:73-83.
23. Young LE, Fairburn HR. Improving the safety of embryo technologies: possible role of imprinting. *Theriogenology* 2000;53:627-648.
24. Hill JR, Burghardt RC, Jones K, et al. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 2000;63:1787-1794.
25. Buczinski S, Fecteau G, Lefebvre RC, Smith LC. Fetal well-being assessment in bovine near-term gestations: current knowledge and future perspectives arising from comparative medicine. *Can Vet J*. 2007;48:178-83.

26. Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, et al. Clinical, Hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 2002;66:1596-1603.
27. Reef VB, Vaala WE, Worth LT, et al. Ultrasonographic evaluation of the fetus and intrauterine environment in healthy mares during late gestation. *Vet Radiol Ultrasound* 1995;36:533-541.
28. Reef VB, Vaala WE, Worth LT, et al. Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: development of an equine biophysical profile. *Equine Vet J* 1996;28:200-208.
29. Manning FA. The fetal biophysical profile score. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999;126:557-577.
30. Heinrichs AJ, Radostits OM. Health management of replacement dairy heifers. In: Radostits OM (ed.), *Herd Health. Food Animal Production Medicine*, 3rd ed, Philadelphia: WB Saunders;2001:365-395.
31. Zaremba W, Grunert E, Aurich JE. Prophylaxis of respiratory distress syndrome in premature calves by administration of dexamethasone or a prostaglandin F2 alpha analogue to their dams before parturition. *Am J Vet Res* 1997;58:404-407.
32. Bertolini M, Mason JB, Beam SW, et al. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* 2002;58:973-994.
33. Tsunoda Y, Kato Y. Recent progress and problems in animal cloning. *Differentiation* 2002;69:158-161.
34. Farin PW, Farin CE. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 1995;52:676-682.
35. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, et al. Cloned transgenic calves produced from non quiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998;280:1256-1258.
36. Perry VEA, Norman ST, Owen JA, et al. Low dietary protein during early pregnancy alters bovine placental development. *Anim Reprod Sci* 1999;55:13-21.

37. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998;3:55-163.
38. Rook JS. Pregnancy toxemia of ewes, does and beef cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2000;16:293-317.
39. Li S, Li Y, Du W, et al. Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. *Biol Reprod* 2005;72:258-265.
40. Williamson M, Tecirlioglu R, French A, et al. Anatomical abnormalities in calves produced by nuclear transfer (Abstract). *Reprod Fertil Dev* 2005;17:187.
41. Wilkins PA, Boston R, Palmer JE, et al. Endothelin-1 concentrations in clone calves, their surrogate dams, and fetal fluids at birth: association with oxygen treatment. *J Vet Intern Med* 2005;19:594-598.
42. Buczinski S, Boysen SR, Fecteau G. Mechanical ventilation of a cloned calf in respiratory failure. *J Vet Emerg Crit Care* 2007;17:179-183.
43. Chavatte-Palmer P, Remy D, Cordonnier N, et al. Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells* 2004;6:94-100.
44. Sangild PT, Schmidt M, Jacobsen H, et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod* 2000;62:1495-1504.
45. Hill JR, Winger QA, Long CR, et al. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod* 2000;62:1135-1140.
46. Matsuzaki M, Shiga K. Endocrine characteristics of cloned calves. *Cloning Stem Cells* 2002;4:261-267.
47. Jonker FH. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2004;82:415-430.
48. Romanini C, Rizzo G. Fetal behaviour in normal and compromised fetus. An overview. *Early Human Dev* 1995;43:117-131.

49. George S, Gunn AJ, Westgate JA, et al. Fetal heart rate variability and brain stem injury after asphyxia in preterm fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R925-R933.
50. Adams-Brandemuehl CS, Pipers FS. Antepartum evaluation of the equine fetus. *J Reprod Fertil* 1987;35:565-573.
51. Jonker FH, Oord HA, van Geijn HP, et al. Feasibility of continuous recording of fetal heart rate in the near term bovine fetus by means of transabdominal doppler. *Vet Q* 1994;16:165-168.
52. Bocking AD Assessment of fetal heart rate and fetal movements in detecting oxygen deprivation in-utero. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;10:S108-S112.
53. Wentzel D, Morgenthal JC, van Niekerk CH, et al. The habitually aborting Angora doe. Foetal heart rate in normal and aborted does. *Agroanimalia* 1974;6:125-128.
54. Breukelman S, Mulder EJH, Van Oord R, et al. Continuous fetal heart rate monitoring during late gestation in cattle by means of Doppler ultrasonography: Reference values obtained by computer-assisted analysis. *Theriogenology* 2006;65:486-498.
55. Hill JR, Edwards JF, Sawyer N, et al. Placental anomalies in a viable cloned calf. *Cloning* 2001;3:83-88.

Table 1: Health status of the dam, evolution of the pregnancy, and outcome of cloned calves/fetuses

Case number	Body condition score at 8 month' gestation*	Chemistry panel, 8 months (abnormal values)	CBC of the dam	Evolution of the dam and the pregnancy	Chemistry panel if readmitted to the hospital	CBC of the dam if readmitted to the hospital	Outcome of the calf or fetus
1	3.0	-	-	Euthanized at 8 months of gestation	-	-	Euthanized on day 250 because of hydrallantois, anorexia and recumbency
2	2.75	↗BHB 1616μmol/L	↗F 6g/L ↘Lymph 2.2×109 /L	Cesarean section performed on day 278	BHB 511 μmol/L	-	Dyspnic and hypercapnic, mechanically ventilated after birth. Cryptosporidiosis on day 10, anemia. Perforated abomasal ulcer and death at 1 month
3	3.0	↗Glob 45.5g/L ↗Anion gap 19.9mmol/L	↗F 7g/L	Premature rupture of fetal membranes on day 266	-	-	Dead fetus, hemorrhagic placenta, congenital hepatic fibrosis, myocardial degeneration
4	3.25	↘Ca 2.19 mmol/L	↗F 6g/L ↘Lymph 2.0×109 /L	Admitted on day 265 for anorexia, weakness, cesarean section on day 268	-	-	Assisted ventilation under general anesthesia, euthanized when 1 day old. Slight portal hepatic fibrosis, left ventricular hypertrophy
5	3.0	↗BHB 1691μmol/L	↗F 6g/L	Cesarean section on day 278, no abnormalities noted with the dam	-	-	Intranasal oxygen at birth, diarrhea when 10 days old, spiral colonic intussusception when 1 month old, free gas bloat at 2 months
6	2.75	↗BHB 1702μmol/L ↘Ca 2.19 mmol/L ↘Glob 24.9 g/L ↘TotProt 58.1 g/L	↗F 6g/L ↘Lymph 2.2×109 /L	Cesarean section on day 267, placental edema, large placentomes	↗BHB 2630 μmol/L ↗GGT 46 IU/L	-	Assisted ventilation under general anesthesia, died at 1 day of age. Pulmonary aspiration of amniotic fluid (subacute placental insufficiency)
7	3.25	↘Glu 2.2 mmol/L ↘Ca 2.14 mmol/L ↗BHB 3267μmol/L ↗Anion gap 19.1 mmol/L	↗F 6g/L	Premature rupture of the fetal membranes, abdominal distension of the heifer. Cesarrean section on day 264	↘TotProt 56.6g/L, ↘Alb 23.6g/L	↗F9g/L, ↗Band neutrophils 0.2×109 /L	Hydrallantois, placental edema, dead fetus, aspiration of amniotic fluid
8	3.25	↘Glu 2.4 mmol/L ↘HCO3 20.7 mmol/L ↗BHB 3627μmol/L ↗Anion gap 19.1 mmol/L	-	Readmitted on day 261 for abdominal distension, anorexia, fever and weakness. Cesarean section on day 268	↗BHB 3060 μmol/L	↗F 8g/L ↘4.6×109 /L Neu	Hydrallantois, placental edema. Bradycardia with absent spontaneous respirations, immediate death, subacute to chronic aspiration of amniotic fluid
9	3.0	↘TotProt 58.7 g/L ↘Glob 23.5g/L ↗Cl 112 mmol/L	-	Uncomplicated pregnancy	↘PT54g/L, ↘Glob 22.9g/L	-	Healthy calf with no detectable abnormalities
10	3.25	-	-	Suspected anasarca, premature rupture of fetal membranes. Cesarean section on day 277	-	F5g/L, ↗Eosinophils 0.7×109 /L	Anasarca fetalis

*Note: case 1 was only 220 days pregnant when examined

Body condition score based on the scale by Heinrich and Radostits (30);

↗ =Increased; ↘=Decreased; Alb=Albumin; BHB=Beta-hydroxybutyrate; CBC=Complete cell blood count; Ca=calcium; Cl=chloride; F=Fibrinogen; GGT=Gamma-glutamyltransferase; Glob=Globulin; Glu=Glucose; HCO3=Bicarbonate; Lymph=Lymphocytes; Neu=neutrophils; TotProt:Total proteins

Table 2: Results of ultrasonographic assessment of late pregnancy cloned fetuses/calves

Case	Days gestation when ultrasonography performed	Fetal heart rate (beats per minute, range)	Fetal activity ¹	Mean placental size (cm ²)	Maximal depth of uterine fluids ² (cm)	Body score of heifer ³	Gestation duration (days)	Birth weight (kg)	Echogenicity score ⁴	Observation	Outcome
1	220	130 (120-140)	1	29	>20	3.0	-	ND	3	Decreased number of placentomes	Hydrallantois, euthanized at 8 months of pregnancy
2	255	120 (112-124)	1	43	6.2	2.75	278	56	1	Small quantity of liquid	Fetus mechanically ventilated, died with abomasal perforated ulcer when 1 month old
3	255	110 (92-124)	3	33	15.5	3.0	266	66	1	Very active fetus	Dead fetus
4	255	110 (104-116)	2	22	19.1	3.25	268	51	1	-	Respiratory distress, mechanical ventilation, died 12h after birth
5	255	106 (104-108)	1	49	18.4	3.0	278	50	1	-	Intranasal oxygen, healthy 1 year later
6	255	110 (100-120)	1	26	18.1	2.75	267	55	2	Chorioallantoic edema	Calf ventilated under general anesthesia, died 24h after birth
7	255	110 (104-120)	1	32	15.2	3.25	264	50	1	-	Hydrallantois, aspiration of amniotic liquid
8	255	118 (116-120)	3	45	17.6	3.25	268	53	3	Large amount of debris in the amniotic fluid	Hydrallantois, placental edema, bradycardia with absent spontaneous respirations, died 30 minutes after birth
9	255	120 (112-124)	1	25	14.1	3.0	279	44	1	-	Healthy at birth and 1 year later
10	255	110 (96-112)	1	40	18.6	3.25	277	60	1	Anasarca, free liquid in the abdomen	Anasarca, dead fetus

¹Fetal activity : ¹ 1=fetus active less than 33% of the examination time (ET); 2=fetus active between 33% and 66% of the ET; 3=fetus active more than 66% of the ET

²Maximal depth of uterine fluid: deepest pocket of allantoic or amniotic fluid that can be assessed when the ultrasonographic examination was done.

³Body condition score based on the scale by Heinrich and Radostits (30);

⁴Echogenicity score: 1=small quantity of echogenic particles in the allantoic and amniotic fluid; 2=moderate amount of echogenic particles in the allantoic and amniotic fluid; 3=large amount of echogenic particles in the allantoic and amniotic fluid

Table 3: Comparison of ultrasonographic findings in heifers # 4, 6, and 8, on which more than 1 ultrasonographic examination was performed

Case	Days gestation when ultrasonography performed	Fetal Heart Rate (beats per minute, range)	Fetal activity ^a	Mean placentome size (cm ²)	Maximal depth of uterine fluids ^b (cm)	Body score of the heifer ^c	Length of gestation (days)	Birth weight (kg)	Echogenicity score ^d	Observation	Outcome
4	255	110 (104-116)	2	22	19.1	3.25	268	51	1	-	Respiratory distress, mechanical ventilation, died 12h after birth aspiration of amniotic fluid
4	265	120 (108-130)	1	33	19.1	2.75	268	51	2	Amniotic membrane 1cm	
6	255	110 (100-120)	1	26	18.1	2.75	267	55	2	Amniotic edema	Calf ventilated under general anesthesia, died 24h after birth
6	260	114 (106-120)	1	41	>20	2.5	267	55	2	Turbidity of allantoic fluid.	
6	264	114 (112-116)	1	37	>20	2.5	267	55	2	Amniotic membrane 0.8 cm	
8	255	118 (116-120)	3	45	17.6	3.25	268	53	3	Large amount of debris in the amniotic fluid	Hydrallantois, placental edema, bradycardia with absent spontaneous respirations, died 30 minutes after birth
8	261	110 (108-120)	1	39	>20	3.0	268	53	2	Amniotic membrane 2.0cm	
8	264	128 (128-132)	2	40	>20	3.0	268	53	2	Amniotic membrane 2.0cm	

^aFetal activity : 1=fetus active less than 33% of the examination time (ET); 2=fetus active between 33% and 66% of the ET; 3=fetus active more than 66% of the ET

^bMaximal depth of uterine fluid: deepest pocket of allantoic or amniotic fluid that can be assessed when the ultrasonographic examination was done.

^cBody condition score based on the (0-5) scale by Heinrich and Radostits (30);

^dEchogenicity score: 1=small quantity of echogenic particles in the allantoic and amniotic fluid; 2=moderate amount of echogenic particles in the allantoic and amniotic fluid; 3=large amount of echogenic particles in the allantoic and amniotic fluid

3.2 Évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal bovin en fin de gestation lors de gestations normales, à risque ou issues de clonage de cellules somatiques

Article à soumettre au Journal of Veterinary Internal Medicine

Fetal well-being assessment by ultrasonographic technique in normal, high-risk, and cloned late bovine pregnancies.

Sébastien Buczinski, Gilles Fecteau, Réjean C. Lefebvre, Lawrence C. Smith.

Département des Sciences Cliniques (Buczinski, Fecteau, Lefebvre)

Centre de Recherche en Reproduction Animale (Lefebvre, Smith)

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada

Correspondence to Dr Buczinski : [information retirée / information withdrawn]

À soumettre au Journal of Veterinary Internal Medicine

Abstract

Background: Transabdominal ultrasonographic fetal well-being assessment is an interesting tool in other species but has not been studied in bovine late pregnancy. It could become a potential tool for the detection of high-risk neonates.

Objective: Establish ultrasonographic parameters of the fetuses and the uterine adnexa in late pregnancy in normal and high-risk pregnancies. Correlate the parameters in relation with perinatal outcome.

Animals: Ten control pregnancies (CONTROL), 10 pregnancies that could be compromised by a maternal disease (HIGH-RISK)) and 10 cloned pregnancies (CLONED) that were more than 260 days pregnant.

Method: Prospective study comparing the ultrasonographic findings of the fetus and the uterine adnexes between the three groups of pregnancy and with the outcome of the fetus.

Results: The mean fetal heart rate was 115 ± 10 bpm for CONTROL group; 93 ± 50 bpm for HIGH-RISK group and 119 ± 12 for CLONED group it was not significantly different between groups ($p=0.14$) and was not associated with fetal outcome except for fetuses with no detectable heart beat ($n=2$). The cloned calves were heavier (57 ± 8 kg) than calves from CONTROL group (36 ± 7 kg), and calves from HIGH-RISK (37 ± 13 kg) ($P=0.003$). There was a statistical tendency for calves that died to be heavier (mean BW=55kg) than survivor calves (mean BW=42) ($p=0.09$). The thoracic aortic diameter was correlated with the fetal birth weight in CONTROL group ($p=0.01$; $R=0.62$). Although fetal activity was not significantly associated with the outcome of the calves, inactive fetuses ($n=2$) during the examination were both non survivor calves.

Conclusions and clinical relevance: Transabdominal ultrasonographic assessment of fetal well-being can be done in late bovine pregnancy. The fetal aortic diameter is a promising tool for assessing fetal growth in late pregnancy. The fetal inactivity and the absence of heart beats when imaging the fetal thorax are both indicative of a fatal fetal prognosis.

The main objective of the fetal well-being assessment is to detect any fetal or adnexal anomalies *in utero*.^{1,2} Invasive and non invasive methods are available and can be used in normal and high-risk pregnancies.³⁻⁵ Fetal well-being assessment using ultrasonography has been described in human,^{6,7} equine⁸⁻¹⁰ and ovine¹¹ species. Potential applications in bovine pregnancy, particularly in high-risk pregnancy such as somatic cloning pregnancy have been reviewed recently.² There are only parcellar data of ultrasonographic findings in the near term bovine pregnancy.^{12-15,a} Bovine cloned pregnancies are considered by many authors as high-risk pregnancies since numerous uterine, placental and fetal abnormalities can compromise the pregnancy.^{13,14,16-19} Various health issues of the neonatal clones have been described including respiratory distress leading to death.²⁰ Some medical problems can be successfully treated but may require intensive care.^{17,19-21}

Any uterine or maternal disease can also have a detrimental impact on fetal well-being and fetal growth. In human pregnancies, inflammatory diseases of the dam can increase prostaglandins and thromboxans production leading to decreased uterine perfusion due to vasoconstriction.²² The fetomaternal membrane inflammatory changes may limit oxygen diffusion and therefore decrease oxygen availability for the fetus.^{23,24} Maternal hypovolemia and shock can also have a negative impact on the fetus by decreasing uterine perfusion and oxygen availability and nutrients transport to the fetus.²³ The high-risk or compromised pregnancies are therefore associated with an increased risk of premature delivery, intrauterine growth retardation (IUGR), fetal morbidity and perinatal mortality.^{9,25,b}

Alteration of the placenta,^{24,26} fetal fluids,^{14,27} fetal heart rate (FHR), fetal heart rate variability (FHRV)^{28,29} and fetal movements^{30,31} are the most clinically useful parameters in human and equine.⁶⁻⁹ These parameters have been assessed successfully by transabdominal ultrasonography in equine fetal evaluation.^{8,9,25,32} Although some studies have focused on fetal ultrasonography in the bovine late term pregnancy,^{12-15,33,34,a} only a small proportion of them were focusing on FHR, fetal movements and the fetal adnexa.^{13,34,a}

The first objective of this study was to establish ultrasonographic parameters of the placenta, the fetal fluids, the fetus, the FHR, the FHRV and fetal movements during the last week of pregnancy in normal, compromised and cloned pregnancies. A second objective was to correlate these parameters in association with neonatal morbidity and mortality. The third objective was to identify potential indicators of bovine fetal demise that may help in the management of high-risk pregnancies.

Material and methods

The ultrasonographic protocole was previously accepted by the institutional animal care committee of the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal (Comité d'Éthique et d'Utilisation des Animaux). The animals studied were more than 260 days pregnant (260 to 272 days of pregnancy). Thirty cows were enrolled and belong to one of the 3 following groups. The first group (CONTROL) was composed of Holstein cows with normal pregnancies. The second group (HIGH-RISK) was composed of Holstein cows admitted to the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) with a severe systemic disease. The last group (CLONED) was represented by Holstein heifers carrying somatic cloned fetuses derived from fibroblastic cells. All cows from the CONTROL and the CLONED groups received dexamethasone^c (25mg, IM) 24 hours prior to the elective caesarean section. The cloned calves were delivered and immediately monitored in a neonatal intensive care unit (NICU) at the CHUV. Reanimation and cardiorespiratory resuscitation were performed when necessary.^{21,e}

All cows were examined in a tie stall without sedation by one of the author (SB) less than 10 days from the delivery. Based of the anatomic projection of the pregnant uterus in late pregnancy (Figure 1),³⁵ their ventral abdomen was clipped from the udder caudally to the xiphoid process cranially, up to the mid flank on the right and to the ventral region on the left (Figure 2). Transabdominal ultrasonography was then performed using a 3.5 MHz^f probe. The uterus, fetal annexes, and fetuses were observed for about 30 minutes. The parameters evaluated were the interval between the day of the ultrasonographic examination and the day of calving (Interval), mean fetal heart rate (FHRm), the mean fetal

aortic diameter (Ao), the fetal activity (ACTIV), the mean placentome area (PLAC), the maximal placentome area (PLACmax), the maximal length (LENGTH) and width (WIDTH) of the placentome during each examination, the maximal depth of fetal fluid (DEPTH), the amniotic membrane thickness (Mthick) and the echogenicity of allantoic and amniotic fluids.

Briefly, the fetal heart rate was counted manually in a 15 seconds period when observing the fetal thorax (3 to 5 measurements at 5 minutes interval), the mean fetal heart rate (FHRm) was then obtained. The mean fetal thoracic aortic diameter was determined as previously described (Ao; 2 to 3 measurements).^{8,9} The fetal activity (ACTIV) was recognised by movements of the fetuses during the ultrasonographic examination and graded from 0 to 3 as described by Reef et al.^{8,9} The fetal activity was graded 0 if no movement was detected, 1 if little movement were detected (showing activity less than one third of the examination time, no activity most of time), 2 if the fetus was fairly active (showing activity more than one third but less than two thirds of the examination time, approximatively 50-50 ratio activity and no activity), 3 if the fetus was very active (showing activity more than two thirds of the examination time, almost consistently active). The pregnant uterus was divided into four quadrants (axial and abaxial cranial, axial and abaxial caudal (Figure 1)). The first placentome observed in each quadrant was used to obtain measurement. The length and width of the placentome were measured. Due to the elliptic form of the bovine placentome,^{35,36} the placentome area was calculated using the formula $(\text{width} \times \text{length}) \times \pi/4$ as previously published.³⁶ The mean placentome area (PLAC) was then calculated using the 4 placentomes areas. The maximal placentome area was recorded for each pregnancy (PLACmax). The maximal length (LENGTH) and width (WIDTH) were recorded for each cow. The maximal depth of fetal fluid (DEPTH) was also measured with a maximal depth of 20cm (limit of the 3.5 MHz probe). The depth was classified in 2 categories (depth<20cm and depth≥20cm) for statistical analysis. The amniotic fluid was identified based on its relatively higher echogenicity when compared to the allantoic fluid which is almost anechoic.¹³ An echogenicity scale from 0 to 3 was used

to assess fetal fluid transparency based on the profile developed in the mare by Reef et al.^{8,9} The fetal fluids (fluid score) were scored 0 if they were anechoic, 1 if only a small amount of echogenic particles were detected, 2 if a moderate amount of echogenic particles were observed and 3 if echogenic particles were present continuously throughout the examination. Two to three measurements of the amniotic membrane thickness that separate the allantoic and amniotic fluid were used to determine a mean amniotic membrane thickness (Mthick).

At birth, body weight was obtained (BW) and newborns were treated according to their cardiovascular and respiratory status. The interval between the day of ultrasonographic examination and the day of delivery was recorded. Outcome in the first week of life was categorized based on the medical files as: NS (dead fetuses or calf dead within 3 hours after delivery, non-survivor calves), S (survivor calves). The S calves were separated in two categories: calves exhibiting any degree of respiratory distress (RD) and survivor calves without clinical signs of respiratory problem (NoRD).³⁵

Statistical analysis

All data were analyzed with statistical analysis software (SAS) version 9.1 package.^g A t-test was used to assess association between the following quantitative data Interval, FHRm, Ao, PLAC, PLACmax, Mthick, BW, and the outcome of calves (NS vs S). The same analysis was used to assess the same parameters according to the 2 categories of S calves (RD vs NoRD). An association between the parameters ACTIV and FHRm was investigated creating a linear model with the parameter ACTIV as a fixed factor. A Chi-squared test was also used to assess qualitative data (ACTIV, DEPTH, fluid score) relative to the outcome of calves (NS vs S), and the outcome of S calves (RD vs NoRD). A linear regression model was used to assess the relationship between Ao and the BW in each group. A linear model was also used to investigate the relation between the FHRm and ACTIV. The exact Chi-squared test was also used to assess the effect of the type of pregnancy on ACTIV, DEPTH, fluid score, outcome, presence of respiratory distress. The quantitative data (Interv, FHRm, Ao, BW, Mthick, PLAC, PLACmax, LENGTH and

WIDTH) were compared in each group using a linear model with the type of pregnancy (CONTROL, HIGH-RISK, CLONED) as the between subject factor.

The level of significance was set at $P < 0.05$. Due to the small number of cows in each group for $0.05 < P \leq 0.10$, the results were considered to reflect a statistical tendency.

Results

A total of 10 pregnancies were included in each 3 groups of experimental groups. The high-risk pregnancies were attributed to various diseases that could affect fetal well-being and pregnancy secondary to decreased placental blood flow, decreased oxygen delivery or severe inflammatory process (right displaced abomasum with severe dehydration ($n=3$); vagal indigestion ($n=2$); hepatic lipidosis ($n=2$); respiratory distress secondary to pharyngeal laceration ($n=1$); downer cow with bleeding abomasal ulcers ($n=1$) and downer cow ($n=1$)).

There was a statistical tendency to have less mortality in CONTROL (0 out of 10) than in HIGH-RISK and CLONED pregnancies (4 out of 10) ($P=0.08$, Table 1). When the survivor calves were divided into RD vs NoRD, there was no statistical differences between CONTROL (1 RD calf out of 10 lived calves), HIGH-RISK (1 RD calf out of 6 lived calves) and CLONED pregnancies (2 RD calves out of 6 lived calves) ($P=0.78$).

The results of the ultrasonographic profiles are presented in tables 1, 2 and 3 for each group of pregnancy. Calves' BW was significantly different according to the group they originated from. Cloned pregnancies had heavier calves (mean= 57 ± 8 kg) than control (36 ± 7 kg) and compromised pregnancies (37 ± 13 kg) ($p=0.003$). There was a statistical tendency for calves that died to be heavier (mean BW= 55 kg) than survivor calves (mean BW= 42) ($p=0.09$). Other parameters were not statistically different between the 3 groups even if the PLACmax tends to be greater in the CLONED group when compared with other groups ($p=0.17$) (Table 1). Two fetuses from the HIGH-RISK group had no heart beats detectable when scanning the thorax. Both fetuses were dead at calving. The FHRm did not differ significantly between the three groups of pregnancy ($p=0.14$). In the HIGH-RISK group the FHRm was 93 ± 50 when all data were compiled or 117 ± 11 when both fetuses

with FHRm=0 were not considered. No association was found between FHRm and fetal activity ($p=0.32$) (Table 2). The fetal activity did not differ with the type of pregnancy (Table 2). Most fetuses were moving less than one third of the total examination time or between one third and two third of the total examination time. The fetuses that were totally inactive throughout the entire examination period ($n=2$) were dead at the time of calving. Two fetuses were moving more than two third of the total examination time. One of these fetuses was a calf from a compromised pregnancy. This fetus was a NS calf. The other fetus was from a control pregnancy and did not have any problem.

The thoracic aortic diameter ($n=19$) was obtained and compared with fetal birth weight ($n=22$). It was possible to obtain both data in only 14 cases. A significant positive linear relation was found with the linear regression model between Ao and BW in CONTROL group ($n=8$) ($R=0.62$; $p=0.01$) (Figure 3). This relation was better estimated by the equation: $Ao=0.0457BW+0.305$ or $BW=2.188Ao-0.667$. No significant relation was found for HIGH-RISK ($n=3$; $p=0.40$) or CLONED ($n=3$; $p=0.42$) groups

The uterine fluid depth was frequently above 20 cm (Table 3). There was a statistical tendency for pregnancies with DEPTH greater than 20 cm for having NS calves ($p=0.07$). The echogenicity score of the uterine fluid was not associated with the outcome of the calf ($p=1.0$).

Discussion

Despite the relatively small number of pregnancies per group and using only one ultrasonographic assessment during the last 10 days of pregnancy valuable information could be obtained from the presented study.

The FHR measurement did not appear to be useful to detect fetal demise. The reported normal bovine FHRm during the last 2 weeks of pregnancy is 105 bpm (from 90 to 125 bpm)³⁸ which is comparable with the results from the present study. The continuous monitoring of FHR and FHR variability is an integrative part of fetal well-being assessment in human obstetric³⁹ as well as in experimental ovine models of pregnancy.² Since FHR is affected by various factors such as fetal movements, development of fetal nervous system

and fetal oxygen supply, this parameter should be useful when suspecting fetal disease.³⁹ There is no easy recording system allowing continuous FHR monitoring in cows. Doppler analysis used for experimental purposes may represent an interesting alternative.^{33,38} The estimation of FHR when performing fetal ultrasonography is used in horses to detect severe bradycardia and tachycardia.^{8,9,b} Severe heart rates abnormalities are associated with equine fetal distress.^{9,40,b} The sensitivity and specificity as well as the predictive values of fetal bradycardia and tachycardia remains unknown in large animals. A recent study establishing guidelines of continuous FHR monitoring interpretation in human pregnancy defined 3 types of FHR patterns with continuous recording of the FHR.⁴¹ The first category (category I) is indicative of normal acid-base status of the fetus (normal baseline FHR, moderate FHR variability and no late or variable decelerations), the category III is indicative of abnormal FHR patterns highly predictive of a compromised acid-base status of the fetus (no FHR variability with bradycardia, or recurrent late and variable decelerations). The category II is not suggestive of a healthy or compromised fetus and requires further monitoring of the fetus in order to classify the FHR as normal or abnormal.⁴¹

Despite the absence of continuous monitoring of the FHR in this study, the punctual assessment of the FHR appeared as an interesting tool to detect dead fetuses as previously mentioned.¹²

The ultrasonographic assessment of fetal activity appeared a valuable tool while evaluating fetal well-being. The fetal inactivity (fetuses with no observable movements during the examination period) and fetal hyperactivity (fetuses moving more than 66% of the examination period) were often associated with a poor prognosis. In horses, fetal inactivity is an indicator of fetal demise^b since the equine fetuses have less sleeping periods than human fetuses.⁹ Normal fetal activity period in cattle remains to be studied in details but fetal inactivity during the 30 minutes of the examination period as well as fetal hyperactivity may indicate fetal distress. The complexity and the precise classification of fetal movement is useful to predict fetal nervous development in human.⁴² However, the size of the late term bovine fetus and the limitations of the ultrasound machine used in the

present study did not allow detailed characterization of the fetal movements. The main movements that were recognised were movements of the limbs and rotational movements about the fetal long-axis. It was difficult to systematically characterise the movement due to the size of the fetus and incapacity of the observer to precisely identify the portion of bone or joint that was seen on the screen. The identification of the specific parts of the fetus that are moving is of potential interest especially since musculoskeletal anomalies such as arthrogryposis are frequently encountered in cloned calves.^{17,22} The precise identification of the fetal metacarpo-phalangeal or metatarso-phalangeal joints during the ultrasonographic examination as well as the ability to observe movements of these joints could potentially help to detect these anomalies *in utero*.

The aortic thoracic diameter is a useful tool to estimate fetal birth weight in the last week of pregnancy with a correlation coefficient (R) from 0.71 to 0.94 in normal equine pregnancies.^{8,43} A linear relation ($BW=aAo+b$) can be used to predict the birth weight of the foal.^{8,43} Despite the facts that we found a correlation between thoracic aortic diameter and the birth weight in CONTROL pregnancy the correlation was lower than in horses. The low number of cases in which both the birth weight and the Ao values were available may account for this low R value. We did not find an association between these parameters in fetuses from CLONED or HIGH-RISK group, but the numbers of data do not allow giving a definitive conclusion concerning this parameter for the assessment of fetal growth. Further studies should compare the growth curves of those different types of pregnancy, because the estimation of fetal birth weight is an useful parameter to detect IUGR fetuses⁴⁴ as well as heavy fetuses which have higher risk of periparturial complications.^{44,45} Other parameters used in human fetal well-being assessment⁴⁴ such as biparietal diameter, femoral length, and abdominal circumference are not obtainable in bovine late pregnancy.² In bovine, the metacarpal or metatarsal widths (the skin to skin transverse diameter) have been correlated with birth weight in Holstein calves when directly measured after birth (n=157), with a R of 0.78 for metacarpal measurement and 0.68 for metatarsal measurement).⁴⁶ This measure could also be accurately obtained *in utero* by performing a

transrectal ultrasonography as recently published in cloned pregnancies (n=14).⁴⁷ However, this parameter could only be measured in the last days of pregnancy when the fetus is located in the pelvic area. By contrast, the Ao could be potentially estimated in earlier stages of pregnancy,^{8,9,14} which is an advantage over the canon bone measurements. The aorta may be difficult to observe systematically, because of the fetal position or movements. More than one examination may be required to obtain the aortic measurements.

Various placental anomalies have been described in late term cloned pregnancies.^{13,26,48-50} They include large placentomes¹⁴ and accessory placentomes (small placentomes between 1 and 3 cm of length).⁴⁸⁻⁵⁰ The number of placentomes may also be variable in cloned pregnancy (normal from 70 to 120)^{48,51} or decreased (less than 50 placentomes).^{48,49} The ultrasonographic assessment of the placentomes in late pregnancy was performed in several studies.^{14,50} Heyman et al. found that the mean placentome area was significantly greater in cloned pregnancies when compared with control pregnancies in days 232 but not in days 247 nor 262 despite the fact that the placentomes were larger in cloned pregnancies.¹⁴ In another study, Kohan-Ghadr et al., reported that the maximal length of the placentome when measured by ultrasonography was significantly larger in cloned pregnancies than in control pregnancies until day 240, but no information was available after this date.⁵⁰ Our results did not show that the mean placentome area or the maximal length of the placentome were significantly different when comparing cloned pregnancies to normal and high-risk pregnancies after day 260. The maximal placentome area tended to be greater in the cloned pregnancies, although this was not significant. The limit of our ultrasonographic assessment of placentation in bovine late pregnancy comes from the fact that the placentomes that were selected for being measured in each uterine quadrant were the first to be seen and this could have biased the data. However, the elaboration of a more objective protocol for assessing the uterus may be difficult since the placentome observation is highly dependant on the position of the fetus. It remains impossible to be able to observe all the placentomes during an ultrasonographic examination in late pregnancy. The

echogenicity of the placentomes may also be altered in cloned pregnancies,⁵⁰ but this information was not noted systematically during the study.

The ultrasonographic examination of the fetal fluids may be a valuable tool for detecting hydrallantois as previously mentioned in cloned pregnancies.^{13,14,26} This complication was not observed in the CLONED group in this study. In human⁵² and horses,⁵³ the maximal depth of the fetal fluid can be helpful in cases of fetal hydrops^{52,53} as well as in cases of oligohydramnios which is associated with fetal demise.⁵² The maximal depth of fetal fluid was frequently more than 20 cm. Although a statistical tendency of for fetuses with a maximal depth higher than 20 cm to die shortly after birth, the clinical signification of this finding may not be relevant since this finding was also found in 6 healthy fetuses of the CONTROL group.

This preliminary study shows that the transabdominal ultrasonography can be a valuable technique for the evaluation of the fetuses and the fetal adnexa in the late pregnancy. Although the data that can be collected may be limited by the size of the fetus and the abdominal depth of the dam, the information that can be obtained may be helpful to assess the fetal integrity, the morphology of the placentomes, and the uterine fluids. A more intensive monitoring is required in cases of inactive fetuses or hyperactive fetuses since those changes in fetal activity may be indicative of fetal distress. Further studies should be performed to increase the knowledge of the materno-fetal interaction as well as their repercussions that can be recorded by transabdominal ultrasound in order to have a biophysical profile as in horses⁹ and humans.⁶ This should be helpful in allowing a better medical management of high-risk pregnancies.

Acknowledgments: The authors thank Guy Beauchamp for his valuable help in the statistical analysis of the data.

Footnotes

^a Buczinski SMC, Fecteau G, Lefebvre RC, et al.. Ultrasonographic assessment of bovine fetal wellbeing during late pregnancy in normal, compromised and cloned pregnancies. 24th ACVIM Congress, Louisville, KY. J Vet Int Med 2006;20:722-723.

^b Reimer JM. Use of transcutaneous ultrasonography in complicated latter-middle to late gestation pregnancies in the mare: 122 cases. Proceeding Am Assoc Equine Pract 1997;43:259-261.

^c Dexamethasone 5, Vétoquinol, Lavaltrie, QC, Canada

^d Lutalyse, Pfizer, QC, Canada

^e Brisville AC, Fecteau G, Boysen SR, et al. Cloned calves' story : Pulmonary dysfunction and oxygen treatment. 25th Annual ACVIM Congress, Seattle, WA. J Vet Intern Med 2007;21:670.

^f Aloka 1700, Tokyo, Japan

^g SAS Institute, version 9.1, Cary, NC, USA.

References

1. Lerner JP. Fetal growth and well-being. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004;31:159-176
2. Buczinski SMC, Fecteau G, Lefebvre RC, et al. Fetal wellbeing assessment in bovine near-term gestations: current knowledge and future perspectives arising from comparative medicine. *Can Vet J* 2007;48:178-183.
3. Baschat AA, Harman CR. Antenatal assessment of the growth restricted fetus. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001;13:161-168.
4. Moore TR. Clinical assessment of amniotic fluid. *Clin Obstet Gynecol* 1997;40:303-316.
5. Wijnberger LDE, Huisjes AJM, Voorbig HAM, et al. The accuracy of lamellar body count and lecithin/sphingomyelin ration in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome: a meta analysis. *Br J Obstet Gynaecol* 2001;108:583-588.
6. Manning FA. The fetal biophysical profile score. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999;26:557-577.
7. Manning FA. Ultrasonography in perinatal medicine. In: Avery GB, ed. *Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn*. 3rd ed, Philadelphia: Lippincott, 1987:110-129.
8. Reef VB, Vaala WE, Worth LT, et al. Ultrasonographic evaluation of the fetus and intrauterine environment in healthy mares during late gestation. *Vet Radiol Ultrasound* 1995;36:533-541.
9. Reef VB, Vaala WE, Worth LT, et al. Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: development of an equine biophysical profile. *Equine Vet J* 1996;28:200-208.
10. Bucca S. Diagnosis of the compromised equine pregnancy. *Vet Clin North Am Eq Pract* 2006;22:749-761.
11. Galan HL, Hussey MJ, Barbera A, et al. Relationship of fetal growth to duration of heat stress in an ovine model of placental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1278-1282.

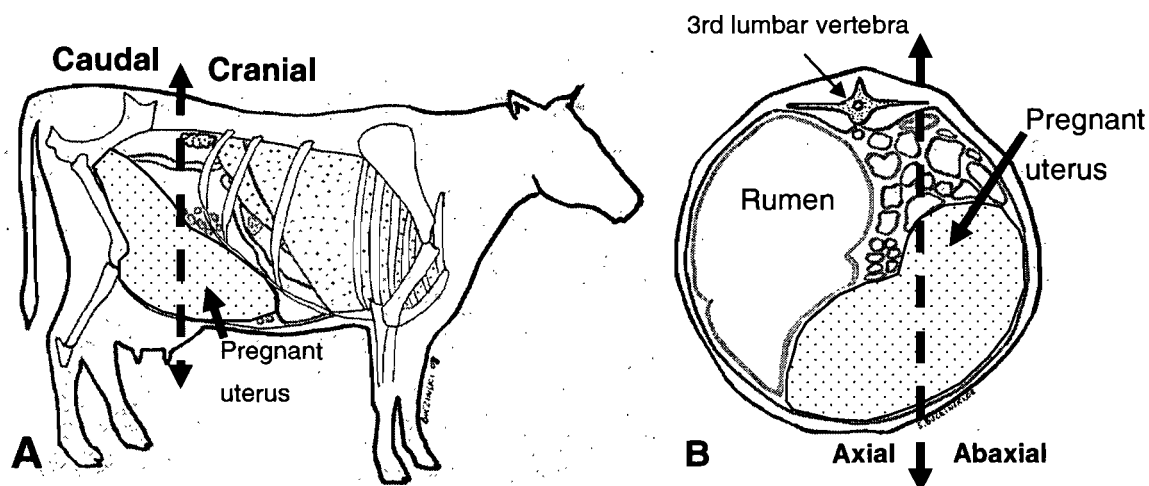
12. Jonker FH. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2004;82:415-430.
13. Buczinski S, Fecteau G, Comeau G, et al. Fetal well-being assessment, neonatal and post partum findings of cloned pregnancy in the bovine specie: 10 fetuses and calves. *Can Vet J* In press.
14. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, et al. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 2002;66:6-13.
15. Taverne MAM, Breukelman SP, Perenyi Z, et al. The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos. *Reprod Nutr Dev* 2002;42:613-624.
16. Smith LC, Bordignon V, Babkine M, et al. Benefits and problems with cloning animals. *Can Vet J* 2000;41:919-24.
17. Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, et al. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 cases studies). *Therio* 1999;51:1451-1465.
18. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998;3:155-163.
19. Garry FB, Adams R, McCann JP, et al. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Therio* 1996;45:141-152.
20. Fecteau ME, Palmer JE, Wilkins PA. Neonatal care of high-risk cloned and transgenic calves. *Vet Clin North Am (Food Anim Pract)* 2005;21:637-653.
21. Buczinski SMC, Boysen SR, Fecteau G. Mechanical ventilation of a cloned calf in respiratory failure. *J Vet Emerg Crit Care* 2007;17:179-183.
22. Cornette L. Fetal and neonatal inflammatory response and adverse outcome. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004;9:459-470.
23. Sibley CP, Pardi G, Cetin I, et al. Pathogenesis of Intrauterine Growth Restriction (IUGR)—Conclusions Derived from a European Union Biomed 2 Concerted Action Project ‘Importance of Oxygen Supply in Intrauterine Growth Restricted Pregnancies’—A Workshop Report. *Placenta Suppl* 2002;23:S75-S79.

24. Renaudin CD, Liu IKM, Troedsson MHT, et al. Transrectal ultrasonographic diagnosis of ascending placentitis in the mare: a report of two cases. *Equine Vet Ed* 1999;11:69-74.
25. Pantaleon LG, Bain FT, Zent W, et al. Equine fetal growth and development. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2003;25:470-477.
26. Constant F, Guillomot M, Heyman Y, et al. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* 2000;75:122-130.
27. Christensen BW, Troedsson MH, Murchie TA, et al. Management of hydrops amnion in a mare resulting in birth of a live foal. *J Am Vet Med Assoc* 2006;228:1228-1233.
28. Yu ZY, Lumbers ER, Gibson KJ, et al. Effects of hypoxaemia on fetal heart rate, variability, and cardiac rhythm. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998;25:577-584.
29. George S, Gunn AJ, Westgate JA, et al. Fetal heart rate variability and brain stem injury after asphyxia in preterm fetal sheep. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2004;287:R925-R933.
30. Velazquez MD, Rayburn WF. Antenatal evaluation of the fetus using fetal movement monitoring. *Clin Obstet Gynecol* 2002;45:993-1004.
31. Olesen AG, Svare JA. Decreased fetal movements: background, assessment, and clinical management. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:818-826.
32. Bucca S, Fogarty U, Collins A, et al. Assessment of feto-placental well-being in the mare from mid-gestation to term: Transrectal and transabdominal ultrasonographic features. *Therio* 2005;64:542-557.
33. Breukelman S, EIJH Mulder, Van Oord R, et al. Continuous fetal heart rate monitoring during late gestation in cattle by means of Doppler ultrasonography: Reference values obtained by computer-assisted analysis. *Therio* 2006;65:486-498.
34. Buczinski S, Bélanger AM, Fecteau G, Roy JP. Prolonged gestation in two Holstein cows: transabdominal ultrasonographic findings in late pregnancy and pathologic findings in the fetuses. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2007;54:624-626.

35. Barone R. Topographie des organes abdominaux d'une vache gravide. *In* : Barone R, Ed. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4 : Splanchnologie II. 3rd ed, Vigot, Paris, 2001;768.
36. Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, et al. Perinatal physiology in cloned and normal calves : Physical and clinical characteristics. *Cloning Stem Cells* 2007;9:63-82.
37. Vestweber JG. Respiratory problems of newborn calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997;13:411-424.
38. Jonker FH, Van Oord HA, Van Geijn HP, et al. Feasibility of continuous recording of fetal heart rate in the near term near term bovine fetus by means of transabdominal Doppler. *Vet Q* 1994;16:165-168.
39. Bocking AD. Assessment of fetal heart rate and fetal movements in detecting oxygen deprivation in-utero. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:S108-S112.
40. Colles CM, Parkes RD, May CJ. Fetal electrocardiography in the mare. *Equine Vet J* 1978;10:32-37.
41. Macones GA, Hankins GD, Spong CY, et al. The 2008 National Institute of Child Health and Human Development workshop report on electronic fetal monitoring: update on definitions, interpretation, and research guidelines. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2008;37:510-505.
42. Romanini C, Rizzo G. Fetal behaviour in normal and compromised fetus. An overview. *Early Hum Dev* 1995;43:117-131.
43. Adams-Brandemuehl CS, Pipers FS. Antepartum evaluation of the equine fetus. *J Reprod Fertil* 1987;35:565-573.
44. Lerner JP. Fetal growth and well-being. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004;31:159-176.
45. Johanson JM, Berger PJ. Birth weight as a predictor of calving ease and perinatal mortality in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2003;96:3745-3755.

46. Takahashi M, Ueki A, Kawahata K, et al. Relationships between the width of the metacarpus or metatarsus and the birth weight in Holstein calves. *J Reprod Dev* 2001;47:105-108.
47. Takahashi M, Goto T, Tsuchiya H, et al. Ultrasonography monitoring of nuclear transferred fetal weight during the final stage of gestation in Holstein cows. *J Vet Med Sci* 2005;67:807-811.
48. Miglino MA, Pereira FTV, Visintin JA, et al. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. *Therio* 2007;68:604-617.
49. Hill JR, Edwards JF, Sawyer N, et al. Placental anomalies in a viable cloned calf. *Cloning* 2001;3:83-88.
50. Kohan-Ghadr HR, Lefebvre RC, Fecteau G, et al. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. *Therio* 2008;69:218-230.
51. Jainudeen MR, Hafez E. Gestation, prenatal physiology and parturition. In: Hafez E. Ed. *Reproduction in farm animals*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1993:217-219.
52. Harman CR. Amniotic fluid abnormalities. *Semin Perinatol* 2008;32:288-294.
53. Christensen BW, Troedsson MHT, Murchie TA, et al. Management of hydrops amnion in mare resulting in birth of a live foal. *J Am Vet Med Assoc* 2006;228:1228-1233.

Figure 1: Anatomic topography of the gravid uterus in bovine late pregnancy (right lateral and transversal views). Adapted from Barone, 2001.³⁵

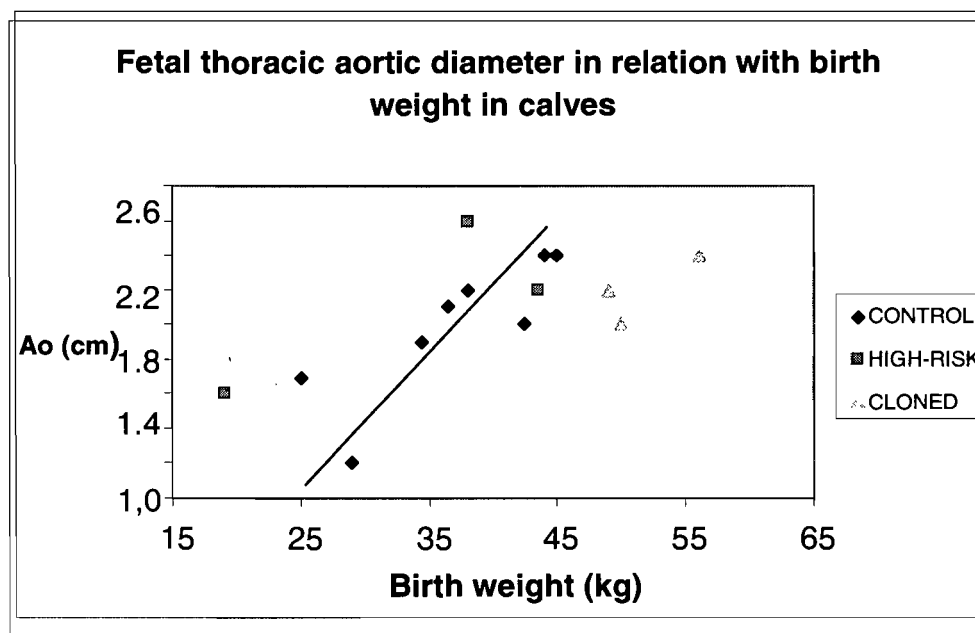


The gravid uterus (white area with black points) in the late pregnancy is occupying the ventral right flank (A). A transversal view at the level of the third lumbar vertebra shows that the gravid uterus extends on the left side of the *linea alba* and up to the mid right flank. The dotted lines showed how the division of the uterine quadrants was determined for the placentome measurements. The cranial and caudal parts of the uterus are represented (A) as well as the axial and abaxial sides of the gravid uterus (B).

Figure 2: Practical assessment of transabdominal ultrasonography for the fetal well-being in late pregnancy in the cow.



Figure 3: Association between thoracic aortic diameters determined by transabdominal ultrasonography and newborn body weight in CONTROL, HIGH-RISK and CLONED pregnancies.



This figure represents the 14 cases in which both the fetal aortic diameter (Ao) and the birth weight (BW) were available. The regression curve has been drawn on the graphs for the fetuses of CONTROL (◆) pregnancies in which a positive correlation ($R=0.62$; $p=0.01$) between Ao and BW was observed. Fetuses from the CONTROL (◆), HIGH-RISK (■) and CLONED groups (▲) are represented. No association was found between Ao and BW in fetuses from HIGH-RISK or CLONED group.

Table 1 : Results of the different quantitative data obtained by transabdominal ultrasonography in control pregnancies, compromised pregnancies and cloned pregnancies.

Parameters	CONTROL			HIGH-RISK			CLONED		
	Mean +/- SD	Range	n	Mean +/- SD	Range	n	Mean +/- SD	Range	n
Interval	1.9 +/- 1.1	0-9	10	2.2 +/- 0.9	0-9	10	3.4 +/- 3.0	0-10	10
FHRm (bpm)	114.5 +/- 10.1	96-128	10	93.1 +/- 50	0-129	10	119.2 +/- 12.3	100-145	10
Ao (cm)	1.99 +/- 0.37	1.2-2.4	9	2.04 +/- 0.38	1.6-2.6	6	2.04 +/- 0.26	1.8-2.4	7
PLAC (cm ²)	20.4 +/- 4.9	13.4-27.6	10	22.0 +/- 8.8	13.4-37.5	10	23.4 +/- 7.7	7.4-33.5	10
PLACmax (cm ²)	28.4 +/- 8.9	16.6-40.8	10	30.1 +/- 9.8	18.9-48.0	10	37.5 +/- 11.8	11.5-62.5	10
LENGTH	8.5 +/- 1.6	6.9-12.3	10	9.4 +/- 1.7	7.3-11.9	10	9.4 +/- 2.1	6.4-12.2	10
WIDTH	4.6 +/- 0.8	3.3-5.7	10	4.3 +/- 0.9	3.3-5.9	10	4.5 +/- 1.2	2.7-6.8	10
Mthick (cm)	0.6 +/- 0.2	0.3-1.0	10	0.5 +/- 0.2	0.2-0.9	10	0.6 +/- 0.34	0.2-1.0	5
NS	0	NA	10	4	NA	10	4	NA	10
RD	1	NA	10	1	NA	6	2	NA	6
BW (kg)	36.3 ^a +/- 6.9	29-45	9	37.4 ^a +/- 13.0	11.9-46.6	4	56.5 ^b +/- 8.2	49.0-72.0	8

Interval: interval between the examination day and calving; FHRm: mean fetal heart rate in beats per minute (bpm); Ao: thoracic aortic diameter; BW: birth weight; PLAC: mean placentome area; PLACmax: maximal placentome area; LENGTH: maximal length of the placentome; WIDTH: maximal width of the placentome; Mthick: allantoamniotic membrane thickness; NS: non survivor calves; RD: calves among survivor calves that developed any degree of respiratory distress; n = numbers of observations. NA: not applicable.

^{ab} The different letters mean that a significant difference between the birth weight of calves in the CLONED group^b when compared with HIGH-RISK and CONTROL GROUP (^a) with a p value of 0.003.

Table 2: Fetal activity scores repartition and mean fetal heart rate (FHRm) repartition according to the fetal activity.

Fetal activity	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
CONTROL*	0	7	2	1
HIGH-RISK*	2	4	3	1
CLONED*	1	7	2	0
Total	3	18	7	2
FHRm (bpm)	0	115	120	123

The score of 0 was attributed to fetuses that were not moving during the entire ultrasonographic examination, the score of 1 was attributed to fetuses moving less than one third of the total examination time, the score of 2 was attributed to fetuses active less than two third but more than one third of the total examination time, the score of 3 was attributed to fetuses moving more than two third of the examination time or active during the total examination time.

*There were no significant differences between the type of pregnancy and the activity score of the fetus (Chi-squared test, $p=0.66$)

There was no association between the FHRm and the level of activity ($p=0.32$) (fetuses with no activity were removed for the analysis).

Table 3: Ultrasonographic measure of the deepest pocket of fetal fluid in CONTROL, HIGH-RISK and CLONED pregnancies.

Depth	>20cm	≤20cm	NS
CONTROL	6	4	0
HIGH-RISK	6	4	4
CLONED	8	2	4
Total	20	10	8

NS: non survivor calves.

Chapitre 4: Discussion générale des résultats

L'ensemble des résultats présentés précédemment démontre que différentes informations pertinentes peuvent être obtenues lors de l'examen ultrasonographique du fœtus et de ses annexes dans le dernier tiers de gestation. Tout d'abord, l'examen transabdominal du fœtus est possible chez la vache en fin de gestation, malgré les caractéristiques de la gestation bovine (large abdomen, fœtus et utérus volumineux). Différents paramètres préalablement sélectionnés d'après une revue préalable de la littérature peuvent être mesurés ou observés lors de l'examen ultrasonographique transabdominal en fin de gestation. Une période d'adaptation est cependant nécessaire afin de pouvoir interpréter les images obtenues de même qu'une bonne maîtrise de l'examen ultrasonographique en général.

Cette étude a démontré l'intérêt de certains paramètres comme facteurs étant associés à une mortalité des fœtus. Ainsi l'activité fœtale permanente ou absente étaient associées à des veaux morts nés ou morts rapidement après la naissance. L'évaluation des mouvements fœtaux est un paramètre utile lors de l'évaluation du bien-être fœtal en médecine obstétricale humaine (Manning, 1999; Manning, 2002). Néanmoins une des différences importantes entre notre étude et les études disponibles chez la femme est que l'échelle utilisée chez les bovins ne tient pas compte de la complexité des mouvements du fœtus ni des régions anatomiques mises en jeu. La complexité des mouvements fœtaux constitue un indice intéressant de la maturation du système nerveux central fœtal (Romanini et Rizzo, 1995) Avec un peu d'expérience néanmoins au cours de l'étude, il était possible de qualifier certains types de mouvements comme des mouvements des membres (se caractérisant par des apparitions et des déplacements de rayons osseux à proximité du tronc ou du thorax) ainsi que des oscillations du thorax autour de l'axe longitudinal du fœtus ou des rotations complètes du thorax et de l'abdomen autour de l'axe longitudinal du fœtus. Une caractérisation des mouvements fœtaux en notant le nombre de ces différents types de

mouvements pendant l'examen pourrait être un indice permettant d'affiner notre compréhension de l'activité du fœtus en fin de gestation.

Une autre problématique plus spécifique des gestations issues du clonage de cellules somatique est l'importance des lésions du système myoarthrosquelettique chez les veaux parmi lesquelles l'arthrogrypose figure en tête de liste (Fecteau et al., 2005; Chavatte-Palmer et al., 2000). Une évaluation des mouvements de l'articulation métacarpo-phalangienne en fin de gestation pourrait également être un paramètre important afin de pouvoir prédire précocement quels fœtus sont à risque de développer cette anomalie au moment de la naissance.

Même si la fréquence cardiaque fœtale constitue un indice intéressant afin de s'assurer des apports adéquats du fœtus en oxygène (Buczinski, 2007b (Annexe 2); Bocking, 2003) et constitue chez l'homme et la brebis un marqueur de la souffrance fœtale; la fréquence cardiaque moyenne n'était pas associée au devenir des fœtus lors de gestations compromises par une maladie maternelle grave ou lors de gestations issues de clonages. Une évaluation continue de la fréquence cardiaque (Breukelman et al., 2006) pourrait fournir plus d'informations que des mesures ponctuelles de la fréquence cardiaque, comme c'est le cas en médecine obstétricale humaine (Macones et al., 2008). L'application d'une sonde Doppler sur la paroi abdominale de la vache après avoir préalablement identifié la position du thorax fœtal à l'aide de l'examen ultrasonographique peut être effectuée chez la vache (Breukelman et al., 2006). La sonde Doppler enregistre alors la fréquence cardiaque et un logiciel informatique permet l'obtention de courbes d'évaluation de la fréquence cardiaque en fonction du temps notant ainsi les périodes d'accélération ou de décélérations de la fréquence cardiaque fœtale. Ce type d'appareillage pourrait fournir de précieuses informations pour détecter des anomalies du fœtus lors de gestations compromises par une maladie maternelle ou issue de clonage.

L'évaluation de la croissance du fœtus est un enjeu important du suivi de la gestation. Cette évaluation fait d'ailleurs partie des investigations systématiques lors des grossesses chez la

femme, qu'elles soient ou non considérées à risque (Lerner, 2004). Alors que différents paramètres sont disponibles pour évaluer la croissance du fœtus bovin en début de gestation (Kahn, 1989), peu de paramètres sont rapportés en fin de gestation. Ceci vient principalement du fait qu'à cause de la grande taille ou de la position du fœtus ces paramètres sont difficiles à évaluer de façon systématique. De plus, certains de ces indices ne sont pas utiles en fin de gestation, c'est le cas par exemple du diamètre oculaire qui ne grossit plus à partir de la mi-gestation (Bertolini et al., 2002). La seconde partie de notre étude a mis en évidence une bonne corrélation entre le diamètre aortique fœtal pris dans les 10 jours précédents la naissance et le poids du veau à la naissance. Une validation obtenue sur un plus grand nombre de gestations reste nécessaire pour confirmer l'importance de ce paramètre, notamment lors de gestations à risque (risque de retard de croissance intra-utérin) ou issue de clones (risque de veaux anormalement gros et donc de dystocie). En outre, des courbes de croissance restent à obtenir afin d'évaluer la variation de ce paramètre en fonction de l'âge du fœtus chez lequel il est évalué.

De nombreux paramètres influencent les résultats de l'évaluation ultrasonographique du fœtus, qu'ils soient ou non pathologiques. Par exemple, en médecine humaine, il a clairement été démontré que différents paramètres fœtaux (notamment les mouvements et l'activité du fœtus) pouvaient varier en fonction du moment de la journée mais aussi en fonction du stade de la grossesse (De Vries et Fong, 2006). De plus, des interactions médicamenteuses peuvent également influencer les résultats obtenus lors de l'examen ultrasonographique du fœtus et de ses annexes. Ainsi, l'administration répétée d'anti-inflammatoires stéroïdiens chez la femme enceinte est à l'origine d'une diminution des mouvements et de l'activité fœtale ainsi que de la variabilité de la fréquence cardiaque fœtale (Mariotti et al., 2004). De plus, les nouveaux-nés issus de ces grossesses sont plus à risques de développer des retards de croissance in utero ou des septicémies (Mariotti et al., 2004). Ces différentes interactions possibles sont autant d'hypothèses à valider chez le bovin et constituent donc des défis intéressants pour les prochaines années dans ce domaine de médecine fœto-maternelle bovine.

L'examen ultrasonographique des annexes fœtales semble également être un indice intéressant pour le suivi des gestations issues de clonage somatique ou également des gestations à risque. La visualisation de placentomes accessoires qui sont des petits placentomes d'une longueur maximale inférieure à 2cm (Kohan-Ghadr et al., 2008; Miglino et al., 2007) semble être une caractéristique spécifique des gestations issues de clonage somatique. Néanmoins, sa signification clinique reste encore à préciser. De même, des placentomes irréguliers et d'une échogénicité hétérogène ont été rapportés lors de gestations issues de clonage associées à diverses anomalies fœtales (arthrogrypose) ou annexielles (hydro-allantoïde) (DesCôteaux et al., 2009). Une évaluation de la morphologie des placentomes ainsi que de leur texture échogénique pourrait apporter une valeur supplémentaire à l'examen ultrasonographique du bien-être fœtal bovin.

La profondeur maximale des liquides utérins est également une variable qui a été évaluée dans la présente étude. Celle-ci s'est fréquemment avérée supérieure à 20cm lors de gestations de plus de 260 jours. Ce seuil de 20cm était le seuil de profondeur maximale qui pouvait être atteint par l'utilisation d'une sonde de 3.5MHz. L'utilisation de sondes de plus basses fréquences (jusqu'à 2MHz) devrait s'accompagner d'une amélioration de l'évaluation de cette mesure puisque ces dernières permettent une profondeur d'examen plus importante (jusqu'à 30cm). Ce gain de profondeur pourrait potentiellement affiner la détermination de la profondeur maximale des liquides utérins. De plus, une mesure de la profondeur maximale de liquide au sein des 4 quadrants utérins pourrait également être effectuée afin de pouvoir disposer d'un outil analogue à l'index de liquide amniotique (Nabhan et Abdelmoula, 2008). Cette variable est mesurée en médecine obstétricale humaine en effectuant la somme des profondeurs maximales de liquide amniotique au sein de chacun des 4 quadrants utérins. Une évaluation de ce type d'index appliqué chez le bovin permettrait de prendre en compte les interférences éventuelles pouvant être liées à la position du fœtus dans la cavité utérine au moment de la réalisation de l'examen, ce qui n'est pas possible présentement avec la détermination d'une seule mesure de profondeur.

Par conséquent cette étude qui visait à décrire différents paramètres ultrasonographiques utérins, fœtaux et annexielles après le troisième tiers de gestation lors de gestations contrôles, de gestations à risque suite à une maladie maternelle et de gestations issues du clonage somatique a montré que de nombreuses informations pertinentes peuvent être obtenues. Cette étude met en évidence de nombreuses pistes de recherche qui mériteraient d'être investiguées dans le futur. Dans un premier temps, il est nécessaire de s'assurer de l'évolution des différents paramètres utilisés (fréquence cardiaque fœtale, activité fœtale, diamètre aortique fœtal, échogénicité des liquides fœtaux, surface placentaire) en fonction du temps de gestation. Ainsi, une étude de cohortes de gestations devrait être réalisée en se basant sur un protocole similaire à une étude réalisée dans l'espèce équine (Bucca et al., 2005) afin de pouvoir noter l'évolution et la répétabilité des paramètres ultrasonographiques des fœtus et de leurs annexes évalués à partir du troisième tiers de gestation (190 jours jusqu'à la naissance). Dans un second temps, une étude clinique devrait également être envisagée afin de pouvoir évaluer les interférences des maladies maternelles bovines fréquemment rencontrées en pratique sur l'ensemble des résultats de l'examen ultrasonographique du fœtus et de ses annexes ainsi que leurs conséquences sur la mortinatalité et la morbidité néonatale. Ces deux types d'études préalables permettraient ensuite dans un troisième temps d'être capable de justifier l'utilisation de l'examen ultrasonographique comme moyen diagnostique pour dépister des anomalies fœtales. L'apport d'un tel outil serait alors indéniable pour le médecin vétérinaire intéressé à la médecine néonatale et obstétricale, puisqu'il permettrait de mettre en place des actions thérapeutiques adaptées vis-à-vis des fœtus dont le pronostic vital est affecté afin maximiser leurs chances de survie.

Conclusion

Comme on a pu le constater, même si des limites existent concernant l'évaluation ultrasonographique transabdominale du fœtus et de ses annexes en fin de gestation, cet examen est néanmoins réalisable chez la vache. En tant qu'examen complémentaire non invasif de la gestation, l'examen ultrasonographique transabdominal fœtal a permis de mettre en évidence des indices potentiels d'une anomalie de la gestation ou du profil de bien-être fœtal. L'émergence des nouvelles techniques de reproduction assistée et notamment le clonage de cellules somatiques qui s'accompagne de coûts importants associés à des complications nombreuses tout au long de la gestation, démontre l'importance de pouvoir diagnostiquer précocement des fins de gestation à risque. Même s'il reste encore de nombreuses questions concernant la répétabilité de l'examen ultrasonographique transabdominal du fœtus, ce dernier s'avère riche de renseignements pour détecter des fœtus morts sans activité cardiaque ainsi que des fœtus anormalement inactifs ou hyperactifs durant la totalité de l'examen ultrasonographique. L'avènement des techniques échographiques Doppler couleur ou pulsé associé à l'examen des principaux vaisseaux fœtaux qui est très utilisé en médecine humaine (Mari et Hanif, 2008), laisse présager des implications intéressantes dans un futur proche pour les gestations bovines notamment pour dépister des anomalies de perfusion du fœtus et du placenta. Une indication supplémentaire de l'examen échographique transabdominal du fœtus en fin de gestation pourrait également être la recherche d'anomalies congénitales lors de gestations à risque ou anormales (Buczinski et al., 2007ab). Cette indication de l'examen échographique constitue une part intégrante des suivis de grossesses (Woodward, 2005). Il manque cependant des données factuelles concernant cette application à l'espèce bovine.

Par conséquent, cette étude a démontré la faisabilité et l'intérêt de l'examen ultrasonographique du fœtus bovin et de ses annexes en fin de gestation. Ce domaine de la médecine vétérinaire bovine est particulièrement intéressant puisqu'il se situe à la frontière entre différentes spécialités de la médecine vétérinaire telles que la thériogénologie, la médecine interne et l'imagerie médicale. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence différents indicateurs potentiels d'altérations du bien-être fœtal, un moyen

d'estimer le poids du fœtus par la mesure du diamètre aortique thoracique fœtal, ainsi que dans un cas le dépistage *in utero* d'un cas d'anasarque fœtal. De futures études devraient nous permettre de mieux comprendre les interactions entre le fœtus, son environnement utérin et maternel en fin de gestation afin de pouvoir gérer au mieux des cas où l'intégrité physique du fœtus est menacée.

Bibliographie

Adams-Brandemuehl CS, Pipers FS. Antepartum evaluation of the equine fetus. *J Reprod Fertil* 1987;35:565-573.

Alexander G. Studies on the placenta of sheep (*Ovis aries* L.): effect of surgical reduction in the number of caruncles. *J Reprod Fertil* 1964;7:307-322.

Anthony RV, Scheaffer AN, Wright CD, Regnault TR. Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reprod Suppl.* 2003;61:183-194.

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destremes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacio MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech* 1999;17:456-461.

Barigye O, Pasquini L, Galea P, Chambers H, Chappell L, Fisk NM. High risk of unexpected late fetal death in monochorionic twins despite intensive ultrasound surveillance: a cohort study. *PLoS Med* 2005;2:522-527.

Barone R. Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4 Splanchnologie II. 3^{ème} Ed, Vigot, Paris, 2001.

Baschat AA, Harman CR. Antenatal assessment of the growth restricted fetus. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001;13:161-168.

Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned and normal calves : Physical and clinical characteristics. *Cloning Stem Cells* 2007;9:63-82.

Beinlich A, Fischäp C, Kaufmann M, Schlößer R, Dericks-Tan JSE. Lamellar body counts in amniotic fluid for prediction of fetal lung maturity. *Arch Gynecol Obstet* 1999;262:173-180.

Bertolini M, Mason JB, Beam SW, Carneiro GF, Sween ML, Kominck DJ, Moyer AL, Famula TR, Sainz RD, Anderson GB. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* 2002;58:973-994.

Bocking AD. Assessment of fetal heart rate and fetal movements in detecting oxygen deprivation in-utero. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;10:S108-S112.

Bocking AD, Gagnon R, Milne KM, White SE. Behavioural activity during prolonged hypoxemia in fetal sheep. *J Appl Physiol* 1988;65:2420-2426.

Bocking AD, Harding R. Effects of reduced uterine blood flow on electrocortical activity, breathing, and skeletal muscle activity in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:655-662.

Bordignon V, Keyston R, Lazaris A, Bilodeau AS, Pontes JH, Arnold D, Fecteau G, Feefer C, Smith LC. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. *Biol Reprod* 2003;68:2013-2023.

Breukelman S, Mulder EJ, van Oord R, Jonker H, van der Weijden BC, Taverne MA. Continuous fetal heart rate monitoring during late gestation in cattle by means of Doppler ultrasonography: reference values obtained by computer-assisted analysis. *Theriogenology* 2006;65:486-498.

Bucca S, Fogarty U, Collins A, Small V. Assessment of the feto-placental well-being in the mare from mid-gestation to term: transrectal and transabdominal ultrasonographic features. *Theriogenology* 2005;64:542-557.

Buczinski S, Bélanger AM, Fecteau G, Roy JP.a Prolonged gestation in two Holstein cows: transabdominal ultrasonographic findings in late pregnancy and pathologic findings in the fetuses. *J Vet Med A.* 2007;54:624-626.

Buczinski S, Fecteau G, Lefebvre RC, Smith LC.b Fetal well-being assessment in bovine near-term gestations: current knowledge and future perspectives arising from comparative medicine. *Can Vet J.* 2007;48:178-83.

Buczinski S, Boysen SR, Fecteau G.c Mechanical ventilation of a cloned calf with respiratory failure. *J Vet Emerg Crit Care* 2007;17:179-183.

Cabrol D, Pons JC, Goffinet F. *Traité d'obstétrique.* Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 2003. pp1154.

- Callan RJ, Schanckel JA, Van Campen H, Mortimer RG, Cavender JA, Williams ES.** Percutaneous collection of fetal fluids for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 2002;220:1348-1352.
- Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Renard JP.** Clonage et physiopathologies de la gestation associées. *Gynecol Obstet Fertil* 2000;28:633-642.
- Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, Chilliard Y, Vignon X, Renard JP.** Clinical, Hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 2002;66:1596-1603.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM.** Cloned transgenic calves produced from non quiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998;280:1256-1258.
- Cornette L.** Fetal and neonatal inflammatory response and adverse outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* 2004;9:459-470.
- Cottrill CM, Jeffers-Lo J, Ousey JC, McGladdery AJ, Ricketts SW, Silver M, Rossdale PD.** The placenta as a determinant of fetal well-being in normal and abnormal equine pregnancies. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44:591-601.
- Curran S, Pierson RS, Ginther OJ.** Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 to 60. *J Am Vet Med Assoc* 1986;189:1295-1302.
- Dalton KJ, Dawes GS, Patrick JE.** Diurnal, respiratory and other rhythms of fetal heart rate in lambs. *Am J Obstet Gynecol* 1977;127:414-424.57.
- Davis GAL.** Évaluation prénatale du bien-être fœtal. *J Soc Obstet Gynaecol Can* 2000;22:463-470.
- De Vries JIP, Fong BF.** Normal fetal motility: an overview. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006;27:701-711.
- DesCôteaux L, Gnemmi G, Colloton J.** Atlas pratique d'échographie pour la reproduction des ruminants et des camélidés : Bovin laitier et de boucherie, taureau, mouton, chèvre, lama, alpage. Éditions Med'Com, Paris, 2009.

- Dubin SB.** Characterisation of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: Relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1989;35:612-616.
- Edwards JF, Karabatsos N, Collison EW, de la Concha Bermejillo A.** Ovine fetal malformations induced by in utero inoculation with Main Drain, San Angelo, and Lacrosse viruses *Am J Tropic Med Hyg* 1997;56:171-176.
- Eigemann UJE, Schoon HA, Jahn D, Grunert E.** Neonatal respiratory distress syndrome in the calf. *Vet Rec* 1984;114:141-144.
- Everitt GC.** Residual effects of prenatal nutrition on the postnatal performance of merino sheep. *Proc N Z Soc Anim Prod* 1967;27:52-68.
- Farin PW, Farin CE.** Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 1995;52:676-682.
- Fecteau ME, Palmer JE, Wilkins PA.** Neonatal care of high-risk cloned and transgenic calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005;21:637-653.
- Fournet P.** Oligoamnios. *In* : Cabrol D, Pons JC, Goffinet F. Ed. *Traité d'obstétrique*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 2003:272-275.
- Ford SP, Christenson LK, Rosazza JP, Short RE.** Effects of Ponderosa spine needle ingestion on uterine vascular function in late-gestation beef cows. *J Anim Sci* 1992;70:1609-1614.
- Fraser AF.** A monitored study of major physical activities in the perinatal calf. *Vet Rec* 1989;125:38-40.
- Fraser AF, Keith NW, Hastie H.** Summarised observations on the ultrasonic detection of pregnancy and fetal life in the mare. *Vet Rec* 1973;92:20-21.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G.** Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003;424:635.
- Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG.** Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 1996;45:141-152.

George S, Gunn AJ, Westgate JA, Brabyn C, Guan J, Bennet L. Fetal heart rate variability and brain stem injury after asphyxia in preterm fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:925-933.

Ginther OJ, Griffin PG. Equine fetal kinetics: Presentation and location. *Theriogenology* 1993;40:1-11.

Gluck L, Kulovich MV, Borer Jr RC, Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1971;109:440-445.

Grand dictionnaire terminologique de l'Office québécois de la langue française. Mot recherché : Bien-être. www.granddictionnaire.com/btml/fra/r_motclef/recherche.asp accès le 06 janvier 2009.

Greenspoon JS, Rosen DJ, Roll K, Dubin SB. Evaluation of lamellar body number density as the initial assessment in a fetal lung maturity test cascade. *J Reprod Med* 1995;40:260-266.

Greenwood PL, Slepatis RM, McPhee MJ, Bell AW. Prediction of stage of pregnancy in prolific sheep using ultrasound measurements of fetal bone. *Reprod Fertil Dev* 2002;14:7-13.

Greenwood PL, Bell AW. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reprod Suppl* 2003;61:195-206.

Guyton AC, Hall JE. The heart. *In*: Guyton AC, Hall JE, eds. *Textbook of Medical Physiology*. 10th ed, Philadelphia: WB Saunders 2000:95-142.

Haddad B, Cabrol D. Dynamique normale du liquide amniotique. *In* : Cabrol D, Pons JC, Goffinet F. Ed. *Traité d'obstétrique*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 2003:21-24.

Heinrichs AJ, Radostits OM. Health management of replacement dairy heifers. *In*: *Herd Health. Food Animal Production Medicine*, Radostits OM (Ed.), 3rd Ed, WB Saunders, Philadelphia, 2001, pp. 365-395.

Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 2002;66:6-13.

Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 cases studies). *Theriogenology* 1999;51:1451-1465.

Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA, Westhusin WE. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod* 2000;62:1135-1140.

Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger OA, Westhusin ME. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 2000;63:1787-1794.

Jainudeen MR, Hafez E. Gestation, prenatal physiology and parturition. *In: Hafez E. Ed. Reproduction in farm animals.* Lea and Febiger, Philadelphia, 1993:217-219.

Jonker FH, Taverne MAM, Van der Weyden GC. Cardiotocography in cows: a method for monitoring calves during delivery. *Theriogenology* 1989;31:425-436.

Jonker FH, Van Oord HA, Van der Weyden GC, Taverne MAM. Fetal heart rate patterns and the influence of myometrial activity during the last month of gestation in cows. *Am J Vet Res* 1993;54:158-163.

Jonker FH, Van Oord HA, Van Geijn HP, Van der Weijden GC, Taverne MAM. Feasability of continuous recording of fetal heart rate in the near term bovine fetus by means of transabdominal Doppler. *Vet Q* 1994;16:165-168.

Jonker FH, Van Geijn HP, Chan WW, Rausch WD, Van der Weijden GC, Taverne MAM. Characteristics of fetal heart rate changes during the expulsive stage of bovine parturition in relation to fetal outcome. *Am J Vet Res* 1996;57:1373-1381.

- Jonker FH.** Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2004;82-82:415-430.
- Kahn W.** Sonographic fetometry in the bovine. *Theriogenology* 1989;31:1105-1121.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y.** Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998;82:2095-2098.
- Kohan-Ghadr HR, Lefebvre RC, Fecteau G, Smith LC, Murphy BD, Suzuki Junior J, Girard C, Hélie P.** Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. *Therio* 2008;69:218-230.
- Larousse.** Dictionnaire de la langue Francaise. Grossesse. <http://www.larousse.fr/ref/medical/grossesse-13427.htm> Accès le 22 janvier 2009.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, OH HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS.** Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 2005;4:641.
- Lindsay MK.** Intrauterine fetal resuscitation of the compromised fetus. *Clin Perinatol* 1999;26:569-594.
- Low JA.** Intrapartum fetal asphyxia: definition, diagnostic, and classification. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:957-959.
- Macones GA, Hankins GD, Spong CY, Hauth J, Moore T.** The 2008 National Institute of Child Health and Human Development workshop report on electronic fetal monitoring: update on definitions, interpretation, and research guidelines. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2008;37:510-505.
- Manning FA.** Ultrasonography in perinatal medicine. In: Avery GB, ed. *Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn*. 3rd ed, Philadelphia: Lippincott, 1987:110-129.
- Manning FA.** The fetal biophysical profile score. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999;26:557-577.
- Manning FA.** Fetal biophysical profile: A critical appraisal. *Clin Obstet Gynecol* 2002;45:975-985.

- Mari G, Hanif F.** Fetal Doppler: umbilical artery, middle cerebral artery, and venous system. *Semin Perinatol* 2008;32:253-257.
- Mariotti V, Maroni AM, Pardi G.** Undesired effects of steroids during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;16(Suppl 2):5-7é
- Marsal K.** Intrauterine growth restriction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002;14:127-135.
- Matsuzaki M, Shiga K.** Endocrine characteristics of cloned calves. *Cloning Stem Cells* 2002;4:261-267.
- McKenna D, Tharmaratnam S, Mahsud S, Bailie C, Harper A, Dornan J.** A randomised trial using ultrasound to identify the high-risk fetus in a low-risk population. *Obstet Gynecol* 2003;101:626-632.
- Mee JF.** Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: a review. *Vet J* 2008;176:93-101.
- Mello MR, Caetano HV, Marques MG, Padilha MS, Garcia JF, Milazzotto MP, Assumpção ME, Lima AS, Nicacio AC, Mendes CM, Oliveira VP, Visintin JA.** Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1485-1489.
- Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y, Watanabe M, Dayan A, Lobo RB, Garcia JM, Smith LC.** Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics* 2001;158:351-356.
- Miglino MA, Pereira FTV, Visintin JA, Garcia JM, Meirelles FV, Rumpf R, Ambrosio CE, Papa PC, Santos TC, Carvalho AF, Leiser R, Carter AM.** Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology* 2007;68:604-617.
- Moore TR.** Clinical assessment of amniotic fluid. *Clin Obstet Gynecol* 1997;40:303-316.
- Muller E, Wittkowski G.** Visualization of male and female characteristics of bovine fetuses by real time ultrasonography. *Theriogenology* 1986;25:571-574.

- Nabhan AF, Abdelmoula YA.** Amniotic fluid index versus single deepest vertical pocket: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Gynecol Obstet* 2008, doi:10.1016/j.ijgo.2008.10.018
- Oback B, Wells DN.** Cloning cattle. *Cloning Stem Cells* 2003;5:243-256.
- O'Donoghue K, Giorgi L, Pontello V, Pasquini L, Kumar S.** Amniocentesis in the last trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 2007;27:1000-1004.
- Olesen AG, Svare JA.** Decreased fetal movements: background, assessment and clinical management. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:818-826.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC.** Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000;289:1188-1190.
- Pantaleon LG, Bain FT, Zent W, Powell DG.** Equine fetal growth and development. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2003;25:470-477.
- Peek SF.** Dropsical conditions affecting pregnancy. *In: Youngquist RS ed. Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* Philadelphia: WB Saunders, 1997:400-403.
- Peters M, Crowe J, Piéri JF, Quartero H, Hayes-Gill B, James D, Stinstra J, Shakespeare S.** Monitoring the fetal heart rate non-invasively: a review of methods. *J Perinat Med* 2001;29:408-416.
- Platt H.** Growth of the equine fetus. *Equine Vet J* 1984;16:247-252.
- Rantanen NW, Kincaid B.** Ultrasound guided fetal cardiac puncture: a method of twin reduction in the mare. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1988;34:173-179.
- Reddy UM.** Prediction and prevention of recurrent stillbirth. *Obstet Gynecol* 2007;110:1151-64.
- Reef VB, Vaala WE, Worth LT, Spencer PA, Hammett B.** Ultrasonographic evaluation of the fetus and intrauterine environment in healthy mares during late gestation. *Vet Radiol Ultrasound* 1995;36:533-541.
- Reef VB, Vaala WE, Worth LT, Sertich PL, Spencer PA.** Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: development of an equine biophysical profile. *Equine Vet J* 1996;28:200-208.

- Reef VB.** Fetal ultrasonography. *In:* Reef VB Ed. Equine Diagnostic Ultrasound WB Saunders, Philadelphia. 1998:425-445.
- Reimer JM.** Use of transcutaneous ultrasonography in complicated latter-middle to late gestation pregnancies in the mare: 122 cases. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1997;43:259-261.
- Renard JP, Chastant S, Chesné P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P, Vignon X.** Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 1999;353:1489-1491.
- Roiz-Hernandez J, Navarro-Solis E, Carreon-Valdez E.** Lamellar bodies as a diagnostic test of fetal lung maturity. *Int J Gynecol Obstet* 2002;77:217-221.
- Romanini C, Rizzo G.** Fetal behaviour in normal and compromised fetus. An overview. *Early Human Dev* 1995;43:117-131.
- Rook JS.** Pregnancy toxemia of ewes, does and beef cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2000;16:293-317.
- Rosén KG, Amer-Wahlin I, Luzietti R, Norén H.** Fetal ECG waveforms analysis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:485-514.
- Schmidt AR, Williams MA, Carleton CL, Darien BJ, Derksen FJ.** Evaluation of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis in the late gestational mare. *Equine Vet J* 1991;23:261-265.
- Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J, Hansen HB.** Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 1996;46:527-529.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M.** A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002;415:859.
- Sim D, Beattie RB, Dornan JC.** Evaluation of biophysical fetal assessment in high risk pregnancy to assess ultrasound parameters suitable for screening in the low-risk population. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999;3:11-17.
- Smith LC, Bordignon V, Babkine M, Fecteau G, Keefer C.** Benefits and problems with cloning animals. *Can Vet J* 2000;41:919-924.

- Takahashi M, Ueki A, Kawahata K, Goto T.** Relationships between the width of the metacarpus or metatarsus and the birth weight in Holstein calves. *J Reprod Dev* 2001;47:105-108.
- Takahashi M, Goto T, Tsuchiya H, Ueki A, Kawahata K.** Ultrasonography monitoring of nuclear transferred fetal weight during the final stage of gestation in Holstein cows. *J Vet Med Sci* 2005;67:807-811.
- Taverne MAM, Breukelman SP, Perényi Z, Dieleman SJ, Vosa PL, Jonker HH, de Ruigh L, van Wagtendonk-de Leeuw JM, Beckers JF.** The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos. *Reprod Nutr Dev* 2002;42:613-624.
- Terao T, Kawashima Y, Noto H, Inamamoto Y, Lin TY, Sumimoto K, Maeda M.** Neurological control of fetal heart rate in 20 cases of anencephalic fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1984;149:201-208.
- Too K, Kanawaga H, Kawata K.** Fetal electrocardiogram in dairy cattle: I. Fundamental study. *Jpn J Vet Res* 1965;13:71-83.
- Troy E.** Hydropic conditions of the bovine uterus. *Bov Pract* 1993;27:183-184.
- Tsunoda Y, Kato Y.** Recent progress and problems in animal cloning. *Differentiation* 2002;69:158-161.
- Vandessplasche M, Oyaert W, Bouters R.** Über die Einhautwassersucht beim Rind. *Wiener Tierarztl Monatschr* 1965;5:461-467.
- Velazquez MD, Rayburn WF.** Antenatal evaluation of the fetus using fetal movements monitoring. *Clin Obstet Gynecol* 2002;45:993-1004.
- Wallace JM, Bourke DA, Aitken RP, Palmer RM, Da Silva P, Cruickshank MA.** Relationship between nutritionally mediated placental growth restriction and fetal growth, body composition and endocrine status in adolescent sheep. *Placenta* 2000;21:100-108.
- Wallace JM, Da Silva P, Aiken RP, Cheyne MA.** Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescent sheep. *J Endocrinol* 1997;155:359-368.
- Wells DN.** Cloning in livestock agriculture. *Reprod Suppl* 2003;61:131-150.

Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:369-368.

Wijnberger LDE, Huisjes AJM, Voorbig HAM, Franx A, Bruinse HW, Mol BWJ. The accuracy of lamellar body count and lecithin/sphingomyelin ration in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome: a meta analysis. *Br J Obstet Gynaecol* 2001;108:583-588.

Wilkins PA, Boston R, Palmer JE, Armstead WM. Endothelin-1 concentrations in clone calves, their surrogate dams, and fetal fluids at birth: association with oxygen treatment. *J Vet Intern Med* 2005;19:594-598.

Williamson M, Tecirlioglu R, French A, et al. Anatomical abnormalities in calves produced by nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev* 2005;17:187.

Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:2095-2098.

Wilson JM, Williams JD, Bondioli KR, Looney CR, Westhusin ME and D. F. McCalla DF. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning) embryo transfer and natural mating. *Anim Reprod Sci* 1995;38:73-83.

Woodward PJ. Diagnostic Imaging: Obstetric Amyrsis, Salt Lake City. 2005.

Young LE, Fairburn HR. Improving the safety of embryo technologies: possible role of imprinting. *Theriogenology* 2000;53:627-648.

Young LE, Sinclair KD, Wilmot I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998;3:55-163.

Youngquist RS. Pregnancy diagnosis. *In:* Youngquist RS. Ed. Large Animal Theriogenology 2nd Edition, Saunders-Elsevier, St-Louis, 2007:294-310.

Zaremba W, Grunert E, Aurich JE. Prophylaxis of respiratory distress syndrome in premature calves by administration of dexamethasone or a prostaglandin F2 alpha analogue to their dams before parturition. *Am J Vet Res* 1997;58:404-407.

Annexe 1 : Fiche d'évaluation ultrasonographique du bien-être fœtal

Vache # TPR maternel Motif examen :
 Date de gestation : jours Durée examen : min
 Date

Suivi du bien être fœtal en fin de gestation

Fréquences cardiaques

	F1	F2	F3	F4	F5
FC					

Activité fœtale

Score 0 1 2 3

Aorte thoracique fœtale: A1: A2: A3: Ao:

Liquides fœtaux

Profondeur maximale :

Echogénicité 0 1 2 3

Mesure de l'épaisseur de la membrane allanto-amniotique (3 mesures)

M1 M2 M3 Moyenne

Unité fœto-placentaire

Mesure de l'épaisseur moyenne des cotylédons

Site	Crâ D	Cd D	Crâ G	Cd G	C
Surface (cm)					

Anomalie échographique :

désengrènement hyperéchogène hétérogène hypoéchogène

Aspects des placentomes :

Remarques éventuelles :

Veau : poids et devenir

Facilité naissance

**Annexe 2 : article de revue de littérature publié dans
Canadian Veterinary Journal 2007;48(2):178-183.**

**Fetal wellbeing assessment in bovine near-term gestations: current
knowledge and future perspectives arising from comparative medicine.**

Sébastien M.C. Buczinski, Gilles Fecteau, Réjean C. Lefebvre, Lawrence C. Smith.

Département des Sciences Cliniques (Buczinski, Fecteau, Lefebvre)

Centre de Recherche en Reproduction Animale (Lefebvre, Smith)

Faculté de Médecine Vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Université de Montréal

3200, rue Sicotte J2S 7C6

Address correspondance to Dr Buczinski, [information retirée / information withdrawn]

Abstract – Cloning technology is associated with multiple losses throughout pregnancy and in the neonatal period. Any maternal or fetal disease can compromise pregnancy. A paucity of data are available on bovine fetal wellbeing in late pregnancy; development of wellbeing assessment methods might augment early diagnosis of abnormal pregnancy or fetal distress, allowing early intervention. This review presents the current knowledge on fetal wellbeing based on bovine, ovine, equine, and human studies, as well as interesting research axes that have been studied in other species and not yet investigated in cattle. Transabdominal ultrasonography allows for diagnosis of large placentomes and hydrallantois that frequently accompanies clone pregnancies. Fetal inactivity or large hyperechoic particles imaged within the fetal annexes are associated with fetal distress or death, and should be reassessed to confirm compromised pregnancy. Measurements of different fetal parameters (thoracic aorta, metacarpal or metatarsal thickness) could be reliable tools for early detection of the large offspring syndrome commonly found in cloned calves.

Résumé – Le clonage bovin s'accompagne de pertes périnatales et en fin de gestation.

Toute affection materno-fœtale peut compromettre la gestation. Les données disponibles sur l'évaluation du bien-être fœtal en fin de gestation sont parcellaires mais permettraient d'anticiper les gestations compromises afin de prendre les décisions appropriées. Cette revue de littérature se base sur les connaissances actuelles du bien-être fœtal bovin, ovin, équin et humain, ainsi que sur les paramètres prouvés intéressants chez les différentes espèces mais n'ayant pas encore été validées chez les bovins. L'évaluation échographique des annexes fœtales permet d'anticiper une augmentation de taille des placentomes qui accompagne certaines gestations clonées. L'hydroallantoïde, une complication des gestations de clones peut être dépistée par une augmentation de la quantité de liquide allantoïde et la difficulté de visualiser le fœtus. Des débris en grande quantité dans les liquides fœtaux, une inactivité fœtale sont compatibles avec une gestation compromise et nécessitent de répéter l'évaluation de la gestation. La mesure échographique de l'aorte thoracique fœtale, de la largeur du métacarpe ou métatarse sont des indices potentiels de suivi de la croissance en fin de gestation qui permettraient d'anticiper le syndrome du gros veau.

Introduction

Delivery of healthy offspring is the ultimate goal of a good breeding program, but in order to maximize reproductive efficiency, a number of assisted reproductive technologies (ART), such as multiple ovulation, embryo transfer, and, more recently, *in-vitro* production (IVP) embryo technologies have been used. While expensive and time consuming, ART enable the production of valuable offspring from genetically superior animals.

Animal cloning, the latest ART, is used for genetic improvement (1), species conservation (2,3), and transgenic animal production for biomedical purposes (4). Notwithstanding the potential advantages of ART to the bovine industry, pregnancies derived from IVP and cloning technologies have been associated with health problems in newborns and surrogate dams (5-11). The large offspring syndrome (LOS), which is characterized by an increased length of pregnancy, fetal oversize, and increased placentome size, has been reported in IVP calves (5-7,9,10). In addition, hydrops of the fetal fluids (hydrallantois, hydramnios) has commonly been reported in cloned pregnancies (5,9).

Disease of the dam also may have an impact on the fetus (12-17). In contrast with LOS, placental insufficiency may result in intrauterine growth retardation and premature calving (17). Maternal stress may also initiate parturition, even if the calf is not fully prepared for extrauterine life. In situations where the dam suffers from a disease with a poor prognosis, it would be helpful to establish if the fetus is fully prepared for birth. Management of these near term high-risk pregnancies is a challenging task for the veterinarian.

The early stages of pregnancy are monitored to some degree during preventive medicine visits (18,19); however, little is known of the assessment of the bovine fetus and uterus during the final stages of pregnancy. In humans (20) and horses (21,22), ultrasonographic biophysical profiles have been described and are currently used in practice. This noninvasive technique detects abnormalities in the placental annexes and in the fetus before birth. High-risk pregnancies can be managed by referring the dam to a neonatal intensive care unit to manage the compromised neonate.

This article reviews techniques to assess fetal wellbeing and emphasizes the different elements that could be included in a biophysical profile to assess fetal viability and health status in the last trimester of pregnancy in cattle.

Review of the literature

The review was based on the following keywords: fetal wellbeing, fetal wellbeing and veterinary, fetal movements, fetal movements and veterinary, fetal distress, fetal distress and ultrasonography, fetal growth and ultrasonography, ultrasonography and late pregnancy, biophysical profile, and lamellar body count. The databases used were Medline and CAB Abstract. Relevant articles were included for review if they were applicable to bovine late pregnancy, done in other large animals (sheep or horses), or used by gynecologists or obstetricians. All studies of fetal wellbeing assessment in cattle and published in peer-reviewed journals were included, with the exception of endocrine profile studies in the dam or the fetus. The emphasis was on noninvasive methods to assess fetal wellbeing.

Assessment of the fetal annexes

During the last trimester of pregnancy, the bovine conceptus can be evaluated indirectly through its annexes (amniotic and allantoic fluid and placental membranes). In contrast to mares (22) and ewes (16), which have been used as animal models for human research, only 1 report of ultrasonographic studies of placental abnormalities during late pregnancy in cattle has been published (23). Experimental models of intrauterine growth retardation (IUGR) in ewes resulted in a decreased placental mass associated with growth-retarded lambs (24). Some of the experimental conditions that caused IUGR in ewes may be found in cattle, such as overfeeding during the growing period (25) and severe malnourishment during the 2nd half of pregnancy (26). The findings in IUGR in sheep suggest that placental ultrasonography and the size of the placentomes may be of use in assessing abnormalities during late pregnancy in sick cows. The growth retardation observed in fetuses of overfed primiparous ewes has been attributed to a primary reduction of placental growth (25). Anomaly of the uteroplacental unit has also been shown to be an important factor in the assessment of fetal wellbeing in diseased mares (13,22); however, the diffuse placentation of the equine species is different from the cotyledonary placentation of ruminant. Although information about ruminant placental characteristics is limited, visual comparison of expelled placentas from in vitro- and in vivo-produced calves from those born from natural conceptions revealed larger placentomes in the in vitro-produced calves (9,27,28). Large placentomes may be the result of compensatory placental growth following placental insufficiency in the 1st trimester of pregnancy (27). Compensatory growth of remaining placentomes was experimentally induced in sheep after caruncles had been surgically removed during early pregnancy (29). Ultrasonography of the near term fetus and placenta in cows carrying normal and cloned fetuses showed an increase of the mean size of placentomes at 232 d of pregnancy in clone pregnancies (25.5 cm^2) compared with the control (17 cm^2) (23).

Hydropic conditions of the bovine uterus are common in clone pregnancies (5-7,9-11,23,27,30). Hydrallantois, the most common hydropic condition in cattle (31,32), is

related to placental abnormality. In contrast, hydramnios is associated with congenital fetal abnormalities (31,32). Macroscopic changes include abdominal distension of the dam, increased fluid in the affected placental compartment, and thickening of the allantoic and amniotic membrane (32). With the exception of the description of the difficulties in observing the fetus in hydrallantois in ultrasonographs (23), no precise ultrasonographic descriptions of these conditions have been reported.

Decreased fetal fluid (oligohydramnios) is also considered to be an abnormal finding in humans (12,20,33) and horses (22,34). In humans, ultrasonographic measurement of the depth of amniotic fluid is used to detect oligohydramnios, which is frequently associated with IUGR, intrapartum asphyxia with increased frequency of deglutition of the fetus, and fetal demise (33). In the equine biophysical profile created by Reef et al. (22), a decrease in fetal fluid depth was significantly associated with a poor outcome of for the foal (22,34). Based on these findings, transabdominal ultrasonography might be an important tool with which to diagnose fetal fluid abnormalities.

Abnormal echogenicity of amniotic fluid has been described with various fetal diseases in foals, such as placentitis, septicemia, and the peripartum asphyxia syndrome; however, abnormal echogenicity also occurred in an apparently normal pregnancy, indicating that it may not be an important prognostic parameter (22). The amniotic and allantoic fluid in normal pregnancies in horses and humans may contain free-floating particles composed of desquamated cells or urinary crystals (35,36) and, in horses, may resemble hemorrhage or meconium. In ruminants, debris is not seen in normal pregnancies and, if observed repeatedly, may indicate a compromised or dead fetus (37).

Amniotic fluid can be sampled to predict fetal lung maturity. In cattle and humans, the lecithin to sphingomyelin (L/S) ratio is correlated with the fetal production of pulmonary surfactant (33,38,39). Lecithin and sphingomyelin are phospholipids that are transferred from the fetal lung to the amniotic cavity: the concentration of sphingomyelin in amniotic fluid is stable, whereas that of lecithin increases during the final stages of pregnancy, causing an increase in the L/S ratio (38). Low amniotic L/S ratios at birth are associated with a poor outcome for bovine neonates. Bovine neonates

in a high-risk pregnancy may develop respiratory problems very similar to those of respiratory distress syndrome in the human infant (38,39). Determination of the L/S ratio is time consuming and not routinely performed in most veterinary laboratories. Consequently, obstetricians have recently developed a rapid screening test to assess lung maturity based on the amniotic lamellar body count (LBC) (40,41). Lamellar bodies are produced by type II alveolar cells and are present in surfactant in increasing quantity as gestation advances (42). The concentration of lamellar bodies in amniotic fluid slowly increases as fetal breathing movements (FBM) increase (41-44). Due to the similarity in size between lamellar bodies (0.2-2 μ m) and platelets (1-3 μ m), quantification may be performed by standard electronic platelet cell counters. This screening test is highly valuable in human neonatology (43,45), but it has yet to be evaluated in other species. Although amniocentesis is considered to be safe in women with complications in fewer than 1% of cases (33), it is a riskier procedure in late pregnancy in the bovine and equine species with 8% and 25% abortion rates, respectively (46,47).

Assessment of the fetus

Assessment of the near-term fetus has the potential to be a reliable and consistent tool to detect fetal abnormalities; however, little information is available (13,20,22,23). In horses, the fetal biophysical profile includes fetal heart rate (FHR), fetal breathing movements (FBM), gross fetal body movements (FM), measurements of fetal aortic diameter, and fetal eye size (13,22).

Disease of the dam may cause a reduction in uterine blood flow and, subsequently, placental insufficiency (14,48). The hypoxemic fetus has bradycardia and decreased variability of heart rate, and decreased FM and FBM (49). In humans, the complexity of FM, fetal behavior, FBM, heart rate variability, and increased FHR following a period of activity are used as markers of fetal wellbeing and in the assessment of neurologic development (49-51). Fetal behavior defined on the basis of FHR patterns, fetal gross body movements, and fetal eye movements may be classified in 4 fetal states: quiet sleep, active sleep, quiet awake, and active awake (51). However, in a recent review, Danish obstetricians pointed out that there is no absolute definition of what is a decreased fetal movement in humans (52). According to Olesen and Svare (52), scientific evidence that antepartum fetal surveillance improved perinatal outcome is inconsistent (52). In horses, lack of fetal movement during the examination of 2 mares was associated with a negative outcome (22). However, equine fetal sleeping periods, manifested by long period of inactivity, have been reported without fetal demise (34,53). The duration of fetal inactivity was usually less than 30 min but infrequently more than 1 h (53). In humans, the fetus has frequent periods without gross movements. Activity occupies 9% to 18% of the time in late pregnancy and is observed frequently in the afternoon than in the morning (53). Therefore, the equine fetus seems to be more active than the human fetus in which periods of sleeping have been more frequently reported. This suggests that decreased fetal movements could be a reliable predictive factor of neonatal anomaly and should be reassessed for reliability as a predictor of fetal health in the equine (22). In 25% involving cases of lack of FM, the foal was completely healthy; however, in 2 cases, sudden bouts of excessive activity were followed by abrupt cessation and death (34). In a more recent study performed over a 3-

year period in 150 pregnancies examined monthly from day 150 to day 300, then weekly until birth, the investigators did not find a correlation between equine fetal movement and outcome of pregnancy (54). These findings show that, as in humans, decreased fetal movement should not be the only factor used to determine if the fetus is compromised. When fetal inactivity is observed a reassessment of the pregnancy should be made.

In ewes, placental hypoxia created by decreasing uterine blood flow causes a rapid decrease in FM (55). Fetal breathing movements are seen as movements of the diaphragm, when fetal or maternal movements are absent (13,20-22), and occur in 30% of examinations in sheep and humans during late gestation (36,49). In hypoxic fetal lambs, there is a transient decrease in the frequency of FBM, as is observed in humans (49,55). After a period of 12 to 16 h of hypoxic injury to the fetus, the frequency of FBM returns to normal despite persistence of the hypoxic injury (56). By contrast, when fetal hypercapnia was combined with hypoxia, the frequency of FBM increased constantly (49). In one study, FBM were assessed in 150 equine pregnancies, but no association was made with fetal wellbeing or frequency of occurrence (54).

There is limited information on FM and FBM in cattle (16,17,49). Fraser (57) used Doppler ultrasound and rectal palpation twice daily during the last week of pregnancy in heifers to evaluate fetal behavior. He observed that all calves showed decreased movements during the last 24 h before calving and that complex movements (more than 4 movement components at each isolated episode of activity) normally occur in late gestation, possibly resulting from a maturation of the nervous system. The depth of the uterus and the size of the calf may be limiting factors for fetal ultrasonography (37).

In horses(13,21,22,34,35), humans (12,20,36,49), sheep (48,58,59), and cattle (23,60-64) FHR is the most frequently reported parameters used to assess fetal wellbeing in the final stages of pregnancy. But interpretation of FHR is complicated (49) due to multiple factors involved in its regulation: baroreceptor, chemoreceptor, sympathetic and parasympathetic nervous systems, and fetal activity (65). In sheep and humans, fetal bradycardia occurs in response to fetal hypoxia due to reflex distribution of cardiac output (49,66). However, in sheep, it is only transient and is followed by a period of tachycardia due to an increased

level of catecholamines (49). Heart rate variability seems to be more reliable than FHR by itself in humans (20,49,66). Heart rate acceleration occurs in response to fetal movements, even if the fetus is hypoxemic (58). However, if hypoxic conditions are sustained, damage to the medulla oblongata and the midbrain is responsible for a loss of FHR variability, as demonstrated in sheep (58) and anencephalic human fetuses (67). Increased FHR can also be paroxysmal when hypoxic fetus shows epileptiform activity (58). In horses, the assessment of fetal wellbeing emphasizes the importance of HR rather than FHR variability (22,34). Decreased or increased FHR, when compared with the FHR of normal pregnancy (68 to 82 beats/min) (21) is considered abnormal (22,34). Rantanen and Kincaid (68) consider bradycardia the most reliable indicator of impending equine fetal demise. A study involving 150 equine pregnancies monitored from day 150 to term, using ultrasonography, indicated that fetal cardiac rhythm was usually regular throughout pregnancy (54).

Various devices have been used to assess FHR in cattle: noninvasive techniques, such as fetal electrocardiography, transabdominal Doppler, and transabdominal ultrasonography (60-63), and invasive techniques, such as fetal aortic catheterization and uterine activity recording via myometrial electrodes (63). The conclusions were that the normal FHR during the last 2 wks of pregnancy is 105 beats/min (with a range of 90 to 125 beats/min) (61) and that FHR acceleration was associated with fetal movements (61); however, myometrial contractions did not significantly influence FHR (63). There is no easy technique to determine FHR variability and movement in cattle. Only periodic measurements of FHR can be performed with noninvasive procedures (ultrasonography or Doppler). Reef et al. (22) proposed that 3 to 5 FHR measurements should be obtained during ultrasonographic recording sessions, when possible before and after fetal movements.

The assessment of fetal wellbeing is aimed at detecting any abnormality of the uterus, the fetal annexes, and the fetus. Any disturbance of one of the above may affect the others. A well recognized harmful effect of abnormal pregnancy in humans (12), foals (15,22), and lambs (16,25) is fetal growth retardation and low birth weight. Oversized newborns, a

newer problem of fetal development associated with new reproductive technologies, such as cloning and in-vitro fertilization, has recently emerged (6,7,11,23,27,28). In humans and sheep, different measurements and their correlations with birth weights have been studied, including fetal head biparietal diameter and fetal abdominal circumference (12,69). Biparietal diameter and metacarpal bone length of lambs are suitable for estimating stage of gestation and birth weights (70). Growth curves have been obtained in humans and sheep when comparing these parameters to birth weights or fetal weights. Once retarded growth is anticipated, medical management can be adapted accordingly (69,70). The problem with large species is that it is not always possible to obtain these measurements due to abdominal depth, fetal position, or size of the bones. Reef et al. (22) measured the systolic aortic diameter at the base of the heart and thoracic width as possible indices of fetal size in the horse; aortic diameter was the only parameter that correlated to birth weight. This parameter was used in cattle by Chavatte-Palmer et al. (23) to assess cloned and normal pregnancies; they found a significant correlation between gestational age and aortic diameter in clones and control calves. However, there was no significant difference in aortic diameter between clones and normal calves, even if a statistical difference in birth weight was present (53 vs. 44kg). Takahashi et al. (71) showed a linear correlation between minimal metacarpal or metatarsal thickness and body weight measured in calves on the day of birth. The metacarpal and metatarsal dimensions were well correlated to the degree of dystocia in pregnancy that were obtained after artificial insemination. The same authors used metacarpal or metatarsal dimension measured via transrectal ultrasonography after determining the presentation of the fetus to anticipate large offspring syndrome in cloned pregnancy (72). These 2 studies indicated that these parameters could be included in a fetal biophysical profile in order to detect early LOS or dystocia.

Other parameters that have been suggested, but not fully validated, include fetal eye size, biparietal diameter, and length of the femoral bone (13). Bertolini et al. (27) indicated that fetal eye size and area were predictive of bovine fetal growth. They also used foreleg length, crown-rump length, and humeral length as potential markers of bovine growth, but these could not be measured after 100 d of pregnancy. Moreover, the size of the fetal eye

was of limited value after day 130 because of the reduction in eye growth in the last part of gestation (27).

Even if the above tools could determine whether a fetus has a normal growth rate, growth is different from maturity. Determining if the calf is fully adapted to extrauterine life is of critical importance to determine the outcome of the conceptus. Endocrinology is a promising tool for assessing fetal adaptation or wellbeing. Matsuzaki and Shiga (73) showed that fetal clones did not have a sufficient prepartum rise in plasma cortisol, leading to failure to initiate the switch to an adult mode in the insulin-like growth system and failure to initiate spontaneous parturition. An indepth discussion about this topic is out of the scope of this article.

Conclusion

There is a lack of well-defined studies to determine the healthy status of a bovine fetus during the last third of pregnancy. However, the widespread use of ART and the problems associated with in vitro-produced embryos and, in particular, cloned embryos (LOS, hydrallantois, respiratory distress, congenital anomalies) highlight the need for better procedures for the early detection of fetal distress or anomaly. Results obtained in other species (human, equine, and ovine) suggest that assessment of FHR, fetal activity, mean placentome size, and thickness of the allantoamniotic membrane should be included in the bovine fetal biophysical profile. However, more extensive studies are needed to increase the level of understanding of bovine late pregnancy. The ultimate goal of this knowledge, as in humans (74,75), is to decrease neonatal morbidity and mortality in low and high-risk pregnancies.

References

1. Smith LC, Bordignon V, Babkine M, Fecteau G, Keefer C. Benefits and problems with cloning animals. *Can Vet J* 2000;41:919-24.
2. Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y, et al. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics* 2001;158:351-6.
3. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:369-78.
4. Bordignon V, Keyston R, Lazaris A, et al. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. *Biol Reprod* 2003;68:2013-23.
5. Mello MR, Caetano HV, Marques MG, et al. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1485-1489.
6. Tsunoda Y, Kato Y. Recent progress and problems in animal cloning. *Differentiation* 2002;69:158-161.
7. Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Renard JP. Clonage et physiopathologies de la gestation associées. *Gynecol Obstet Fertil* 2000;28:633-642.
8. Renard JP, Chastant S, Chesne P, et al. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 1999;353:1489-1491.
9. Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, et al. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 cases studies). *Theriogenology* 1999;51:1451-1465.
10. Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J, Hansen HB. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 1996;46:527-529.
11. Fecteau ME, Palmer JE, Wilkins PA. Neonatal care of high-risk cloned and transgenic calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005;21:637-653.

12. Baschat AA, Harman CR. Antenatal assessment of the growth restricted fetus. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001;13:161-168.
13. Pantaleon LG, Bain FT, Zent W, Powell DG. Equine fetal growth and development. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2003;25(6):470-477.
14. Cottrill CM, Jeffers-Lo J, Ousey JC, et al. The placenta as a determinant of fetal well-being in normal and abnormal equine pregnancies. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44:591-601.
15. Platt H. Growth of the equine fetus. *Equine Vet J* 1984;16:247-252.
16. Anthony RV, Scheaffer AN, Wright CD, Regnault TRH. Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reprod Suppl* 2003;61:183-194.
17. Greenwood PL, Bell AW. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reprod Suppl* 2003;61:195-206.
18. Curran S, Pierson RS, Ginther OJ. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 to 60. *J Am Vet Med Assoc* 1986;189:1295-1302.
19. Muller E, Wittkowski G. Visualization of male and female characteristics of bovine fetuses by real time ultrasonography. *Theriogenology* 1986;25:571-574.
20. Manning FA. The fetal biophysical profile score. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999;26:557-577.
21. Reef VB, Vaala WE, Worth LT, Spencer PA, Hammett B. Ultrasonographic evaluation of the fetus and intrauterine environment in healthy mares during late gestation. *Vet Radiol Ultrasound* 1995;36:533-541.
22. Reef VB, Vaala WE, Worth LT, Sertich PL, Spencer PA. Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: development of an equine biophysical profile. *Equine Vet J* 1996;28:200-208.
23. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 2002;66:6-13.
24. Greenwood PL, Bell AW. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reprod Suppl* 2003;61:195-206.

25. Wallace JM, Bourke DA, Aitken RP, Palmer RM, Da Silva P, Cruickshank MA. Relationship between nutritionally mediated placental growth restriction and fetal growth, body composition and endocrine status in adolescent sheep. *Placenta* 2000;21:100-108.
26. Everitt GC. Residual effects of prenatal nutrition on the postnatal performance of merino sheep. *Proc N Z Soc Anim Prod* 1967;27:52-68.
27. Bertolini M, Mason JB, Beam SW, et al. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* 2002;58:973-994.
28. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998;3:155-163.
29. Alexander G. Studies on the placenta of sheep (*Ovis aries* L.): effect of surgical reduction in the number of caruncles. *J Reprod Fertil* 1964;7:307-322.
30. Wells DN. Cloning in livestock agriculture. *Reprod Suppl* 2003;61:131-150.
31. Peek SF. Dropsical conditions affecting pregnancy. In: Youngquist RS ed. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 1997:400-403.
32. Troy E. Hydropic conditions of the bovine uterus. *Bov Pract* 1993;27:183-184.
33. Moore TR. Clinical assessment of amniotic fluid. *Clin Obstet Gynecol* 1997;40:303-316.
34. Reimer JM. Use of transcutaneous ultrasonography in complicated latter-middle to late gestation pregnancies in the mare: 122 cases. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1997;43:259-261.
35. Adams-Brendemuehl C, Pipers FS. Antepartum evaluation of the equine fetus. *J Reprod Fertil Suppl* 1987;35:565-573.
36. Manning FA. Ultrasonography in perinatal medicine. In: Avery GB, ed. *Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn*. 3rd ed, Philadelphia: Lippincott, 1987:110-129.
37. Jonker FH. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2004;82-82:415-430.

38. Zaremba W, Grunert E, Aurich JE. Prophylaxis of respiratory distress syndrome in premature calves by administration of dexamethasone or a prostaglandin F2 α analogue to their dams before parturition. *Am J Vet Res* 1995;58:404-407.
39. Eigemann UJE, Schoon HA, Jahn D, Grunert E. Neonatal respiratory distress syndrome in the calf. *Vet Rec* 1984;114:141-144.
40. Gluck L, Kulovich MV, Borer Jr RC, Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1971;109:440-445.
41. Dubin SB. Characterisation of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: Relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1989;35:612-616.
42. Beinlich A, Fischäp C, Kaufmann M, Schlöber R, Dericks-Tan JSE. Lamellar body counts in amniotic fluid for prediction of fetal lung maturity. *Arch Gynecol Obstet* 1999;262:173-180.
43. Roiz-Hernandez J, Navarro-Solis E, Carreon-Valdez E. Lamellar bodies as a diagnostic test of fetal lung maturity. *Int J Gynecol Obstet* 2002;77:217-221.
44. Greenspoon JS, Rosen DJ, Roll K, Dubin SB. Evaluation of lamellar body number density as the initial assessment in a fetal lung maturity test cascade. *J Reprod Med* 1995;40:260-266.
45. Wijnberger LDE, Huisjes AJM, Voorbig HAM, Franx A, Bruinse HW, Mol BWJ. The accuracy of lamellar body count and lecithin/sphingomyelin ration in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome: a meta analysis. *Br J Obstet Gynaecol* 2001;108:583-588.
46. Callan RJ, Schanckel JA, Van Campen H, Mortimer RG, Cavender JA, Williams ES. Percutaneous collection of fetal fluids for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 2002;220:1348-1352.
47. Schmidt AR, Williams MA, Carleton CL, Darien BJ, Derksen FJ. Evaluation of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis in the late gestational mare. *Equine Vet J* 1991;23:261-265.

48. Ford SP, Christenson LK, Rosazza JP, Short RE. Effects of Ponderosa spine needle ingestion on uterine vascular function in late-gestation beef cows. *J Anim Sci* 1992;70:1609-1614
49. Bocking AD Assessment of fetal heart rate and fetal movements in detecting oxygen deprivation in-utero. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:S108-S112.
50. Velazquez MD, Rayburn WF. Antenatal evaluation of the fetus using fetal movements monitoring. *Clin Obstet Gynecol* 2002;45:993-1004.
51. Romanini C, Rizzo G. Fetal behaviour in normal and compromised fetus. An overview. *Early Hum Dev* 1995;43:117-131.
52. Olesen AG, Svare JA. Decreased fetal movements: background, assessment and clinical management. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:818-826.
53. Fraser AF, Keith NW, Hastie H. Summarised observations on the ultrasonic detection of pregnancy and fetal life in the mare. *Vet Rec* 1973;92:20-21.
54. Bucca S, Fogarty U, Collins A, Small V. Assessment of feto-placental well-being in the mare from mid-gestation to term: Transrectal and transabdominal ultrasonographic features. *Theriogenology* 2005;64:542-557.
55. Bocking AD, Harding R. Effects of reduced uterine blood flow on electrocortical activity, breathing, and skeletal muscle activity in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:655-662.
56. Bocking AD, Gagnon R, Milne KM, White SE. Behavioural activity during prolonged hypoxemia in fetal sheep. *J Appl Physiol* 1988;65:2420-2426.
57. Fraser AF. A monitored study of major physical activities in the perinatal calf. *Vet Rec* 1989;125:38-40.
58. George S, Gunn AJ, Westgate JA, Brabyn C, Guan J, Bennet L. Fetal heart rate variability and brain stem injury after asphyxia in preterm fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:925-933.
59. Dalton KJ, Dawes GS, Patrick JE. Diurnal, respiratory and other rhythms of fetal heart rate in lambs. *Am J Obstet Gynecol* 1977;127:414-424.
60. Too K, Kanawaga H, Kawata K. Fetal electrocardiogram in dairy cattle: I. Fundamental study. *Jap J Vet Res* 1965;13:71-83.

61. Jonker FH, Van Oord HA, Van Geijn HP, Van der Weijden GC, Taverne MAM. Feasability of continuous recording of fetal heart rate in the near term bovine fetus by means of transabdominal Doppler. *Vet Q* 1994;16:165-168.
62. Jonker FH, Taverne MAM, Van der Weyden GC. Cardiotocography in cows: a method for monitoring calves during delivery. *Theriogenology* 1989;31:425-436.
63. Jonker FH, Van Oord HA, Van der Weyden GC, Taverne MAM. Fetal heart rate patterns and the influence of myometrial activity during the last month of gestation in cows. *Am J Vet Res* 1993;54:158-163.
64. Jonker FH, Van Geijn HP, Chan WW, Rausch WD, Van der Weijden GC, Taverne MAM. Characteristics of fetal heart rate changes during the expulsive stage of bovine parturition in relation to fetal outcome. *Am J Vet Res* 1996;57:1373-1381.
65. Guyton AC, Hall JE. The heart. In: Guyton AC, Hall JE, eds. *Textbook of Medical Physiology*. 10th ed, Philadelphia: WB Saunders 2000:95-142.
66. Manning FA. Fetal biophysical profile: A critical appraisal. *Clin Obstet Gynecol* 2002;45:975-985.
67. Terao T, Kawashima Y, Noto H, et al. Neurological control of fetal heart rate in 20 cases of anencephalic fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1984;149:201-208.
68. Rantanen NW, Kincaid B. Ultrasound guided fetal cardiac puncture: a method of twin reduction in the mare. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1988;34:173-179.
69. Marsal K. Intrauterine growth restriction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002;14:127-135.
70. Greenwood PL, Slepatis RM, McPhee MJ, Bell AW. Prediction of stage of pregnancy in prolific sheep using ultrasound measurements of fetal bone. *Reprod Fertil Dev* 2002;14:7-13.
71. Takahashi M, Ueki A, Kawahata K, Goto T. Relationships between the width of the metacarpus or metatarsus and the birth weight in Holstein calves. *J Reprod Dev* 2001;47:105-108.
72. Takahashi M, Goto T, Tsuchiya H, Ueki A, Kawahata K. Ultrasonography monitoring of nuclear transferred fetal weight during the final stage of gestation in Holstein cows. *J Vet Med Sci* 2005;67:807-811.

73. Matsuzaki M, Shiga K. Endocrine characteristics of cloned calves. *Cloning Stem Cells* 2002;4:261-267.
74. McKenna D, Tharmaratnam S, Mahsud S, Bailie C, Harper A, Dornan J. A randomised trial using ultrasound to identify the high-risk fetus in a low-risk population. *Obstet Gynecol* 2003;101:626-632.
75. Sim D, Beattie RB, Dornan JC. Evaluation of biophysical fetal assessment in high risk pregnancy to assess ultrasound parameters suitable for screening in the low-risk population. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999;3:11-17.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Sébastien Maurice Czeslaw Buczinski		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences cliniques

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs Buczinski S, Fecteau G, Lefebvre RC, Smith LC	
Titre Fetal well-being assessment in bovine near-term gestations: current knowledge and future perspectives arising from comparative medicine	
Revue Publié 2007;48:178-183	Date de publication 2007;48:178-183

Auteurs Buczinski S, Fecteau G, Comeau G, Boysen SR, Lefebvre RC, Smith LC	
Titre Fetal well-being assessment, neonatal and postpartum findings of cloned pregnancies in cattle: A preliminary study on 10 fetuses and calves.	
Revue Canadian Veterinary Journal	Date de publication Accepté

Auteurs Buczinski S, Fecteau G, Lefebvre RC, Smith LC	
Titre Fetal well-being assessment in bovine late pregnancy: ultrasonographic findings in normal, high-risk, and cloned pregnancies.	
Revue Journal of Veterinary Internal Medicine	Date de publication En préparation